KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT VON EISENTRANSPORTIERENDEN SIDEROCHROMEN (SIDEROPHOREN) AN NEUROSPORA CRASSA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

HANSPETER SCHICKLE

aus Karlsruhe

1980

KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT VON EISENTRANSPORTIERENDEN SIDEROCHROMEN (SIDEROPHOREN) AN NEUROSPORA CRASSA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

HANSPETER SCHICKLE

aus Karlsruhe

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 04.09.1980
Dekan: Prof. Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Winkelmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zähner

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Günther Winkelmann

in der Zeit von März 1977 bis Juli 1980 im Institut für Biologie I der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. Günther Winkelmann und Herrn Prof. Dr. Hans Zähner (Lehrstuhl Mikrobiologie I) herzlich.

Herrn Prof. C.F. Bardele und Fräulein Fees danke ich für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0074

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 5

2.1. Chemikalien 5

2.2. Versuchsorganismen 6

2.3. Anzuchtbedingungen 7

2.3.1. N.crassa ota (arg-5, ota, aga, R3) 7

2.3.2. N.crassa slime (A sg, fz, os-1) 7

2.4. Animpfmethode 8

2.5. Trockengewichtsbestimmung 8

2.6. Gewinnung und Reinigung der verwendeten Siderochrome 8

2.7. Konzentrationsbestimmung 9

2.8. Dünnschichtchromatographische Identifizierung 9

2.9. Herstellung von Desferrocoprogen 9

2.10. Herstellung von Siderochromderivaten 10

2.10.1. Herstellung von [^{55}Fe]-Siderochrom 10

2.10.2. Herstellung von N-[1-^{14}C]acetyl-Coprogen B 10

2.10.3. Herstellung von [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen 10

2.10.4. Herstellung von Dextran-Coprogen 10

2.10.5. Herstellung von N-(11-amino-undecanyl-) Coprogen B (11C) 11

2.10.6. Herstellung von Ferritin-(SPDP)-N-(11-amino-undecanyl-)Coprogen B (F11C) 11

2.11. Messung der Radioaktivität im Scintillationszähler 11

2.12. Siderochromaufnahmeversuche 12

2.13. Siderochromaufnahme im Temperaturgradienten 12

2.14. Isolierung der Plasmamembran von N.crassa sl. 13

2.15. Plasmamembran-Extrakte in 2-Chloräthanol 13

2.16. Gleichgewichtsdialysen 14

2.17. Sauerstoffbestimmung 14

2.18. Proteinbestimmung 14

2.19. Rechnerische Behandlung der kinetischen Meßdaten 15

Seite

3. ERGEBNISSE 16

3.1. Fehlerbestimmung der kinetischen Versuche 16

3.2. Kinetik der Coprogenaufnahme 16

3.2.1. Kinetik der Coprogenaufnahme im Eisenmangel 16

3.2.2. Kinetik der Coprogenaufnahme im Nichteisenmangel 20

3.3. Kinetik der Hemmung des Coprogentransports 24

3.3.1. Coprogentransporthemmung im Eisenmangel 24

3.3.1.1. Hemmstoff: Ferrirubin 24

3.3.1.1.1. Kinetik der Ferrirubinhemmung des Coprogentransports im Lineweaver-Burk Diagramm 24

3.3.1.1.2. Kinetik der Ferrirubinhemmung des Coprogentransports im Dixon-Webb Diagramm 29

3.3.1.2. Hemmstoff: Coprogen-Dextran 31

3.3.1.3. Hemmstoffe: 11C und F11C 33

3.3.2. Coprogentransporthemmung im Nichteisenmangel 36

3.4. Kinetik der Ferrirubinaufnahme im Eisenmangel und im Nichteisenmangel 38

3.4.1. Kinetik der Ferrirubinaufnahme im Lineweaver-Burk Diagramm 38

3.4.2. Zeitabhängige Aufnahme von Ferrirubin 41

3.4.3. Kinetik der Ferrirubinaufnahme im Scatchard-Diagramm 42

3.5. Energetik des Sideramintransports 44

3.5.1. Hemmung des Coprogentransports durch KCN und N_2 44

3.5.2. Ferrirubinanlagerung mit und ohne KCN 47

3.6. Mechanismus der Coprogenaufnahme 48

3.6.1. Zeitabhängige Aufnahme doppeltmarkierten Coprogens 48

3.6.2. Aufnahmebilanz im Medium und in den Mycelien nach 10min. Inkubation 50

Seite

3.6.3. Nachweis von Fe^{2+} im Medium mit Ferrozine (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenyl-Sulfonic Acid)-1,2,4-Triazine) 54

3.6.4. Hemmung der Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen mit DNP und Ferrirubin 55

3.6.5. Hemmung der Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen durch Begasen mit N_2 58

3.6.6. Effekt der KCN- bzw. der Ferrirubingabe nach drei Minuten Inkubation von 0.1 µM [$^{55}Fe/^{14}C$]-Coprogen auf die aufgenommene Menge an ^{55}Fe- und ^{14}C-Aktivität 58

3.6.7. Bestimmung des Anreicherungsfaktors der Coprogenaufnahme bei N.crassa 62

3.6.8. Zeitabhängige Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen im Nichteisenmangel 65

3.7. Quantifizierende Untersuchungen der Transportstellen für Siderochrome 66

3.7.1. Bestimmung der Wechselzahl einer Transportstelle 66

3.7.2. Bestimmung der Transportstellenzahl pro Spore und μ^2 Keimschlauchoberfläche 70

3.8. Temperaturabhängigkeit der Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen 71

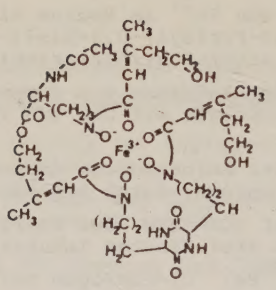
3.9. Gleichgewichtsdialysen mit Plasmamembranextrakten, lipophilen Extrakten und ganzen Zellen von Neurospora crassa slime 73

4. DISKUSSION 74

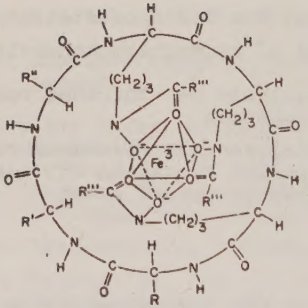
1. Sättigungsverhalten der Coprogenaufnahme 78
2. Hemmungskinetik 80
3. Interaktion Ferrirubin - Siderochromtransportsystem 82
4. Der Weg des Liganden 83
5. Der Weg des Fe(III)-Zentralions 85
6. Energetik des Coprogentransports 87
7. Mechanismus der Coprogenaufnahme 91

5. ZUSAMMENFASSUNG 97

6. LITERATURVERZEICHNIS 99



COPROGEN



FERRIRUBIN R,R' = $HOCH_2$-

R'' = H

R''' = $H-C=C(CH_3)-CH_2-CH_2OH$

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cpm	counts per minute
dpm	decays per minute
DNP	2,4-Dinitrophenol
EDAC	1-Äthyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) - Carbodiimid
F	Fehler
WZ	Wechselzahl
K_m	Michaelis-Konstante
K_S	Substrat-Konstante
K_I	Inhibitor-Konstante
r	Radius
l	Länge
11C	N-(11-amino-undecanyl-)Coprogen B
F11C	Ferritin-(SPDP)-N-(11-amino-undecanyl-)Coprogen B
Ferrozine	3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonsäure)-1,2,3-triazin
SPDP	N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate)
Saline	0,9 % NaCl-Lösung

1. Einleitung

Neilands definiert Siderochrome als kleinmolekulare Substanzen, die mit Phenolat- oder Hydroxamatgruppen ein Fe^{3+}-Ion komplexieren können. Sie werden von Mikroorganismen als eisenfreie Desferriverbindungen in das Medium ausgeschieden (22).

Mit Fe^{3+} bilden die Desferrisiderochrome einen stabilen elektrisch neutralen Komplex. Als Richtgröße für deren Stabilitätskonstante wird 10^{30} angegeben (27), die einzelnen Werte können aber von 10^{27} bis 10^{33} schwanken. Bei physiologischem pH-Wert, d.h. bei pH 7, liegt Eisen in wäßriger Lösung als $Fe(OH)_3$ vor, dessen Löslichkeitsprodukt mit 10^{-36} (19) bis 10^{-39} (3) bestimmt wurde. Freie Fe^{3+}-Ionen sind deshalb in wäßriger Lösung kaum nachweisbar, in Gegenwart von Desferrisiderochromen kann jedoch der Eisenkomplex aufgrund seiner Stabilitätskonstanten gebildet und somit das Eisen in Lösung gebracht werden.

Neurospora crassa synthetisiert neben verschiedenen anderen Desferrisiderochromen hauptsächlich Desferricoprogen als Eisenkomplexbildner. Desferricoprogen entsteht durch Kondensation von jeweils drei δN-Hydroxyornithin und drei trans 5-Hydroxy-3-methylpenten-(2)-säure unter Ausbildung von zwei Amid- und drei Hydroxamatgruppen, welche die Liganden des Zentralions darstellen. Zwischen zwei der oben erwähnten Molekülgruppen tritt eine Esterbindung auf. Eine freie α-Aminogruppe ist N-acetyliert.

Einige Siderochrom-Eisen-Komplexe werden von den Mikroorganismen aufgenommen und das Zentralion dem Stoffwechsel zugänglich gemacht. Diese werden als Siderophore bezeichnet (47). Durch die Komplexbildung erfährt das gesamte Molekül eine Lipoidisierung, da die hydrophilen, polaren Anteile sich als Liganden um das zentrale Fe^{3+}-Ion anordnen (29).

Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise, daß nur aufgrund ihrer partiellen Lipidlöslichkeit die Siderochrome die Cytoplasmamembran nicht passieren können:

1. Die Siderochromaufnahme ist durch SH-Gruppen alkylierende Reagenzien inhibierbar (12,13,44). Alkylierte SH-Gruppen stehen einer Diffusion eines amphiphilen Moleküls durch die Cytoplasmamembran nicht im Wege.

2. Verschiedene Siderochrome mit vergleichbarer Lipidlöslichkeit weisen stark unterschiedliche Aufnahmeraten auf. Meistens werden die spezieseigenen Siderochrome bevorzugt aufgenommen (13,43). Diese Selektivität kann ein Diffusionsvorgang durch die Cytoplasmamembran nicht leisten.

3. Die Siderochromaufnahme kann durch spezifische Hemmstoffe, wie z.B. nicht spezieseigene Siderochrome, gehemmt werden (12,13,43,44). Gegenseitige Hinderung des Diffusionsprozesses tritt erst bei wessntlich höheren, unphysiologischen Konzentrationen der beteiligten Moleküle auf.

4. Die Siderochromaufnahme ist durch den Mikroorganismus selbst steuerbar. Sie tritt nur im Eisenmangel auf, während eisenversorgte Mycelien sehr kleine Transportraten aufweisen (43). Würde das Siderochrom nach den Gesetzen der Diffusion in die Zelle gelangen, so müßte die beobachtete Regulation über eine Änderung der Lipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran vonstatten gehen. Da man jedoch weiß, daß die Cytoplasmamembran von Mikroorganismen neben dem Coprogentransport auch noch andere Aufgaben zu erfüllen hat, erscheint eine totale Umstellung der Membranzusammensetzung aufgrund des eisenversorgten Zustands unwahrscheinlich.

Zur Weiterverwendung des Eisens im mikrobiellen Stoffwechsel, wie z.B. zum Einbau in Protoporphyrin, muß das Zentralion der Siderochrome dekomplexiert und reduziert werden. Über den Ort und den Mechanismus der Dekomplexierung und Reduzierung gibt

es keine detaillierten Vorstellungen. Zwei verschiedene Mechanismen wären denkbar: Das Fe^{3+}-Ion wird reduktiv dekomplexiert. Die Bindungskonstante von Desferricoprogen zu Fe^{2+} ist wesentlich geringer als zu Fe^{3+} (10^{8} im Gegensatz zu 10^{30}) (27). Andererseits wäre auch durch eine Spaltung der Esterbindung zwischen Hydroxyornithin und der Pentensäure eine Dekomplexierung möglich, wahrscheinlicher jedenfalls als die Spaltung einer Hydroxamat-Gruppe. Durch die fortbestehende Affinität der Spaltprodukte zu Fe^{3+} bewirkt jedoch die Aufspaltung des Liganden keine große Änderung der Stabilitätskonstanten der ursprünglichen Komplexe.

In dieser Arbeit soll versucht werden, durch kinetische Untersuchungen die Existenz eines Siderochrom-Transportsystems nachzuweisen. Ausgehend von der freien Beweglichkeit natürlicher Ionophoren in der Mitochondrienmembran selbst in ihren enantiomeren Formen und der teilweise unspezifischen Siderochromaufnahme bei Bakterien, wird die Funktion der Ionophoren darauf beschränkt, ohne Kontakt mit einem Rezeptorsystem den Transport des Zentralions durch die Biomembranen zu übernehmen (30). Ebenso wird die Existenz eines Beweises für ein Transportsystem der Ionophoren als nicht gegeben diskutiert (33,34).

Die Untersuchungen über den Coprogentransport bei Neurospora crassa werden weitgehend mit den Methoden der Enzymkinetik durchgeführt. Man kann die Wirkung eines Transportsystems in einer Biomembran durchaus mit der eines freien, gelösten, katalytischen Proteins vergleichen. Die eigentliche katalytische Tätigkeit ist bei einem Transportsystem nicht die chemische Veränderung eines Substrats, sondern dessen Translokalisierung von einem Kompartiment in ein anderes.

Zur Auswertung der kinetischen Meßdaten wurde ein Computerprogramm erstellt und auf einer DIGITAL PDP-11 Rechenanlage implementiert. Die Berechnungen basieren stets auf einer Regressionsanalyse, welche in eine beliebige Anzahl von Punkten die optimale Gerade legt. Die durchschnittliche prozen-

tuale Abweichung der Punkte von der Geraden ist dabei zur Beurteilung des Experiments von Bedeutung und wird deshalb numerisch und graphisch vom Programm ausgegeben. Liegt der Fehler der Regressionsanalyse über dem experimentell bedingten Meßfehler, so ist die gewählte mathematische Bearbeitung unzulässig.

Folgende Problematiken sollen in dieser Arbeit behandelt werden:

- Kinetik des Coprogentransports im Eisenmangel und im Nichteisenmangel,
- Kinetik der Hemmung des Coprogentransports,
- Energetik der Coprogenaufnahme,
- Untersuchungen zum Mechanismus der Coprogenaufnahme.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Substanzen der Firma Merck AG, Darmstadt.

Von Boehringer GmbH, Mannheim:
Adenosin-5'-Triphosphat, di-Natriumsalz
β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduzierte Form

Von Fluka AG, Buchs, Schweiz:
1,4-Diamino-butan-dihydrochlorid (Putrescin)

Von Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden:
Sephadex (LH 20, LH 60, Dextran 70, BHB-activated Dextran 70), SPDP

Von Koch Light Lab. Ltd., Colbrook-Bucks, U.K.:
Unisolve-1

Von Radiochemical Centre, Amersham, U.K.:
$^{55}FeCl_3$ in 0,1 N HCl, carrier free
(0,5 mCi/2.2 µg Fe)
[1-^{14}C]-Acetat,Na-Salz (1 mCi/mmol)

Von Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg:
Dextran T-500, Cellulose-Ionenaustauscher
Servachrom-XAD-2

Von Sigma, St. Louis, MO., U.S.A.:
Desoxyribonuklease DN-25 (beef pancreas)

3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenyl-Sulfonic Acid)-1,2,4-Triazine (Ferrozine)

Von Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.:
Bacto-Agar, Bacto-Malt Extract, Bacto-Yeast Extract

Ferrirubin wurde von Prof. W. Keller-Schierlein zur Verfügung gestellt.
Coprogen B wurde von Herrn Matzanke überlassen.

2.2. Versuchsorganismen

Neurospora crassa arg-5, ota, aga, R3

Bei dieser Tripelmutante sind alle drei zu Ornithin führenden Enzyme blockiert: Acetylornithin-Transaminase, Ornithinaminotransferase und Arginase. Da Ornithin Vorstufe und Hauptbestandteil der Sideraminbiosynthese darstellt, kann diese Mutante völlig sideraminfrei kultiviert werden und ist damit zur Beobachtung der Sideraminaufnahme geeignet (6,12,44). Die Mutante wächst in Minimalmedium unter Zusatz von Asparagin, Arginin und Putrescin.

Neurospora crassa A sg, fz, os-1 slime (FGSC* 1118)

Diese Mutante wurde von Emerson 1963 isoliert (10). Sie besitzt keine äußere Zellwand und wächst deshalb nur in osmotisch stabilisiertem Minimalmedium (4 % Sorbit). Genauere genetische Grundlagen für die Expression des Phänotyps "slime" sind noch nicht geklärt, jedoch scheinen die Genmarker osmotic (os), fuzzy (fz), spontaneous germination (sg) notwendig zu sein.

2.3. Anzuchtbedingungen

2.3.1. N.crassa ota (arg-5, ota, aga, R3)

Gewinnung der Konidiosporen:

Anzucht auf komplexem festem Medium mit 1,5 % Agar, 0,4 % Hefeextrakt, 1 % Malzextrakt, 0,4 % Glukose bei 27° C. Nach 7 Tagen erfolgte Aberntung wie beschrieben (12): Abschwemmen mit Saline (10^{-3} Tween 80) und Filtration durch Glaswolle. Aufbewahrung bei 4° C etwa einen Monat.

Anzucht der Konidiosporen:

Die Anzucht erfolgte in einem chemisch definierten Minimalmedium: 5 g L-(-)Asparagin, 1 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 µg Biotin, 100 mg Putrescin, 50 mg Arginia, 2 g Glucose (getrennt autoklaviert) in 2 l H_2O, pH 5.5. Für N.crassa ist dieses Medium ein Eisenmangelmedium (9 µg/100 ml), d.h. der Wildtyp beginnt verstärkt Desferricoprogen auszuscheiden. 100 ml Minimalmedium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane wurden mit 10^{10} Konidien beimpft und 16 Stunden bei 27° mit 150 Upm inkubiert.

2.3.2. N.crassa slime (A sg, fz, os-1)

Die Mutante wurde in kontinuierlicher Anzucht auf Schrägagar + 4 % Sorbit (Komplexmedium) bei 27° C gehalten. Wöchentlich wurde auf neuen Agar überimpft, da N.crassa slime bei 4° C nicht aufbewahrt werden kann.

Zur Anzucht in Flüssigkultur wurde dem in 2.3.1. angegebenen Minimalmedium 4 % Sorbit, 0,1 % Hefeextrakt und 0,15 % Pepton zugesetzt. 100 ml dieses Mediums in 500 ml Erlenmeyerkolben wurden mit der Öse beimpft und bei 27° mit 100 Upm inkubiert.

Nach drei Tagen wurde 1 ml für die Beimpfung eines weiteren Kolbens ohne Hefeextrakt und Pepton entnommen (Minimalmedium + 4 % Sorbit). Nach 3 bis 4 Tagen konnte die rötliche Zellsuspension zur Membranisolierung eingesetzt werden.

2.4. Animpfmethode

Um 16-Stunden-Mycelien von Neurospora crassa-ota-Mutante (2.2.) herzustellen, wurde folgende Animpfmethode eingesetzt:

Anzuimpfendes Minimalmedium wurde mit 0.1 g getrennt autoklavierter Glucose versetzt und mittels Eisbad auf 0° C gekühlt. Das Schüttelbad wurde zur Hälfte mit dest. H_2O, zur anderen Hälfte mit Eis aufgefüllt. Die Stromzufuhr dafür erfolgte über eine Zeitschaltuhr, welche zu einem einzustellenden Zeitpunkt die Heizung sowie den Schüttelmotor anstellt. In dieses Eis-Schüttelbad wurde der mit 0.2 ml Sporensuspension (nach 2.3.1.) angeimpfte Erlenmeyerkolben gestellt.

2.5. Trockengewichtsbestimmung

Auf einem zuvor gewogenen Membranfilter wurden 20 ml Mycelien-suspension abgesaugt. Das Trocknen der abgesaugten Mycelien erfolgte über Nacht bei 60° im Trockenschrank. Bestimmung des Gewichtsunterschieds erfolgte auf der Analysenwaage. Die Trokkengewichtsbestimmung erfolgte nach den Siderochromaufnahmeversuchen (2.12.).

2.6. Gewinnung und Reinigung der verwendeten Siderochrome

Desferricoprogen wurde durch Fermentation von N.crassa (Wildtyp) gewonnen. Vier 100 ml Minimalmedium-Kolben wurden wie beschrieben (2.3.1.) mit N.crassa beimpft und zwei Tage inku-

biert. Danach wurden die Mycelien auf Papierfilter abgesaugt und dem Kulturfiltrat $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ im Überschuß zugesetzt (2 g/l). Dieses so gewonnene Rohcoprogen wurde an DOWEX XAD-2 adsorbiert und mit dest. H_2O gewaschen. Die Siderochrome wurden mit steigender Acetonitrilkonzentration sukzessiv von der Säule eluiert (2,5 %, 5 &, 10 %, 20 %). Durch Säulenchromatographie an CM-Cellulose wurden die gewünschten Fraktionen von Coprogen B und anderen positiv geladenen Substanzen gereinigt. Identifikation der einzelnen Fraktionen siehe 2.8.

2.7. Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Siderochrome erfolgte photometrisch bei 436 nm mit den von Neilands angegebenen Extinktionskoeffizienten (28).

2.8. Dünnschichtchromatographische Identifizierung

Reinheitsprüfung und Identifizierung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Fa. Merck, Darmstadt). Als Laufmittel kam das für die Trennung von Phosphatiden und Glycolipiden gebräuchliche Laufmittel: Chloroform:Methanol:Wasser = 65:25:4 zur Verwendung (17).

2.9. Herstellung von Desferricoprogen

Die Dekomplexierung wurde wie beschrieben (21) mit 8-Hydroxychinolin vorgenommen. Der entstandene Hydroxychinolin-Eisenkomplex wurde mit Chloroform ausgeschüttelt.

2.10. Herstellung von Siderochromderivaten

2.10.1. Herstellung von [^{55}Fe]-Siderochrom

10 nmol Desferrisideramine in 2 ml dest. H_2O wurden mit 20 µl $^{55}FeCl_3$ versetzt (20 µl $^{55}FeCl_3$ = 5,5 µg Fe/ml = 0,1 nmol/µl). Je 20 µl wurden den Inkubationsreagenzgläsern zugegeben.

2.10.2. Herstellung von N-[1-^{14}C]acetyl-Coprogen B

Die Herstellung von [^{14}C]-Coprogen erfolgte aus dünnschichtgereinigtem Coprogen B und [1-^{14}C]-Essigsäure (57 µCi/µmol). Die Carboxylgruppe der Essigsäure wurde mit EDAC aktiviert. Der Syntheseansatz enthielt: 20 µmol Coprogen B, 5 µmol [1-^{14}C]-Acetat und 50 mg EDAC bei pH 4.7. Unter leichter Magnetrührung wurde EDAC tropfenweise zugegeben. Die Reinigung erfolgte über DEAE-Sephadex (Entfernen von Essigsäure), CM-Cellulose (Entfernen von Coprogen B) und DOWEX XAD-2 (Entfernung von EDAC).

2.10.3. Herstellung von [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen

Die Herstellung doppeltmarkierten Coprogens erfolgte nach 2.10.1. unter Verwendung von [^{14}C]-Coprogren als Sideramin (2.10.2.). Zur besseren radioaktiven Messung im Scintillationszähler (2.11.) wurde ein zehnfacher Überschuß an ^{55}Fe-Aktivität eingestellt.

2.10.4. Herstellung von Dextran-Coprogen

Gleich molekulare Mengen an BHP-aktiviertem Dextran 70 (Deutsche Pharmacia) und Coprogen B wurden in 0.1 M Borat-Putter bei pH 9 und 25° C 20 Stunden gerührt. Um noch aktive Gruppen

zu blockieren, wurde 0.1 M Mercaptoäthanol zugegeben und bei Raumtemperatur 24 Stunden belassen. Durch Sephadex-Gelfiltration (G10) wird überschüssiges Mercaptoäthanol sowie nicht gebundenes Coprogen B abgetrennt.

2.10.5. Herstellung von N-(11-amino-undecanyl-)Coprogen B (11C)

20 µmol 11-amino-undecansäure wurde mit 300 µmol EDAC aktiviert. Nach 5 Minuten Rühren wurde der Reaktionslösung 7.5 µmol Coprogen B zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 4.6 gehalten. Nach 12 Stunden Rühren bei Zimmertemperatur wurde das Reaktionsprodukt (11C) durch Säulenchromatographie von abgespaltenen Reaktionsteilnehmern und nicht umgesetzten Reaktanten gereinigt (siehe 2.10.2.). Die Identifizierung von 11C erfolgte dünnschichtchromatographisch nach 2.8.

2.10.6. Herstellung von Ferritin-(SPDP)-N-(11-amino-undecanyl-) Coprogen B (F11C)

0.1 mM Ferritin wurde mit 0.2 mM SPDP nach dem vom Hersteller beschriebenen Verfahren gekoppelt (Pharmacia Fine Chemicals). 10 µmol 11C (siehe 2.10.5.) wurde ebenfalls mit SPDP gekoppelt, letzteres Reaktionsprodukt jedoch wurde reduziert, so daß mit Ferritin-SPDP-Kopplungsprodukt (unreduziert), unter Ausbildung einer Disulfidbrücke ein gemeinsames Molekül entstehen konnte (siehe Hersteller-Anleitung). Reinigung des Reaktionsendproduktes (F11C) erfolgte mit einer Sepharose 6 B-Säule.

2.11. Messung der Radioaktivität im Scintillationszähler

Einfachmarkierte Proben wurden im Mark I (Nuclear-Chicago) in 10 ml Unisolve-1 nach mehrstündiger Äquilibrierung auf ihre Radioaktivität überprüft.

Die radioaktive Bestimmung doppeltmarkierter Proben wurde im Kontron MR 300 vorgenommen. Je nach vorhandenem Quench optimiert dieses Gerät die energiespektrographischen Fenster und hält auf diese Weise den Spillover des höherenergetischen Isotops in den niederenergetischen Meßkanal konstant auf ungefähr 10 %. Berechnung und Ausgabe der drei Quenchkurven sowie die jeweiligen dpm-Berechnungen erfolgten automatisch.

2.12. Siderochromaufnahmeversuche

16 Stunden in Minimalmedium inkubierte Konidiosporen wurden auf Papierfilter abgesaugt und zweimal mit 100 ml Minimalmedium gewaschen. Zur Resuspendierung wurde dem Minimalmedium 1 g Glukose/100 ml zugegeben. Davon wurde jeweils 1 ml zu den markierten Sideraminen gegeben. Die die Inkubationsmischung enthaltenden 10 ml Zentrifugengläser wurden im Wasserbad bei 27° C und 300 Upm 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die keimenden Sporen auf Membranfilter (Fa. Sartorius, Porengröße 3 µ Ø 2,5 cm) abgesaugt und dreimal mit 20 ml Saline nachgewaschen. Die Filter wurden wie beschrieben (2.11.) auf ihre Radioaktivität geprüft. Zur Trockengewichtsbestimmung siehe 2.5.

2.13. Siderochromaufnahme im Temperaturgradienten

Der Versuchsablauf erfolgte grundsätzlich wie unter 2.12. beschrieben.

die 10minütige Inkubation wurde in einem dafür hergestellten Metallblock vorgenommen. Der mit Bohrungen für die Reaganzgläser ausgestattete Block wurde von der einen Seite aus mit 60° beheizt, von der anderen Seite mit -5° gekühlt. Die gesamte Apparatur wurde auf eine Schüttelmaschine geschraubt.

2.14. Isolierung der Plasmamembran von N.crassa sl.

Zur Plasmamembranisolierung nach Slayman (39) kamen 2 l der nach 2.3.2. aufgezogenen Zellsuspension zur Verwendung. Das durch Zentrifugation (10 min, 700 g) erhaltene Pellet wurde mit eiskaltem Puffer A (6 % Mannitol, 10 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris, pH 7.5) zweimal gewaschen. Die Abzentrifugation erfolgte jeweils 5 min bei 170 g. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte wurden ebenfalls bei 0° - 4° C durchgeführt. Die gewaschenen Zellen wurden mit Puffer A gelöst (10 mg Protein/ml) und in 10 ml Portionen in 40 ml Zentrifugengläser aufgeteilt. Nachdem 12,5 mg Concanavalin A enthaltende 10 ml Puffer A zugegeben wurden, erfolgte innerhalb 5 Minuten nach Zugabe von Concanavalin A Unterschichtung mit Puffer B (wie Puffer A, nur mit 9 % Mannitol) und Abzentrifugation bei 170 g, 5 min. Das mit 10 ml Puffer B gewaschene und mit 170 g, 5 min. abzentrifugierte Pellet wurde in ein großes Volumen an Lysierpuffer (10 mM Tris, 5 mM $MgSO_4$, 100 mg DNase/Liter), welcher DNase enthält, eingebracht. Die Proteinkonzentration im Lysierpuffer darf 0,4 mg/ml nicht überschreiten. Die Lösung wurde 30 Minuten im Eisbad gerührt. Die 30 Minuten bei 170 g abzentrifugierten Rohmembrane wurden, in 5 ml Lysierpuffer aufgelöst, 40 mal im Glas-Teflon-Potter homogenisiert und in 12 ml Portionen auf 30 ml Puffer B überschichtet und 30 Minuten bei 170 g abzentrifugiert. Das Pellet konnte, in 10 mM Tris, pH 7.5, aufgeschwemmt (Proteinkonzentration 10 mg/ml), in flüssigem Stickstoff 2 Monate aufbewahrt werden.

2.15. Plasmamembran-Extrakte in 2-Chloräthanol

Zweimal destilliertes (K_p 127,9° C) 2-Chloräthanol wurde zu den gereinigten Plasmamembranen (2.11.) tropfenweise zugegeben und mit einem Glasstab gerührt, bis eine rötliche, fast klare Lösung entstand. Nicht gelöste Membranteile wurden bei 10.000 g/10 min. abzentrifugiert, der klare Überstand für Bindungsstudien verwendet.

Da 2-Chloräthanol stark hepatoxisch ist, wurden alle Handhabungen unter dem Abzug vorgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte im Dunkeln bei -25°, um die Entstehung von Abbauprodukten zu vermeiden bzw. zu verlangsamen.

2.16. Gleichgewichtsdialysen

Für die Gleichgewichtsdialysen kam ein Dianorm-Gerät der Firma Dr. Virus KG, Bonn, zur Verwendung. Das Halbzellendialysiervolumen der Teflon-Mikrozellen betrug 200 µl, die Dialysierfläche 1,54 cm^2 (Q-Faktor = 15,4). Die in dest. H_2O 12 Stunden gequollenen Dialysiermembrane hatten eine Ausschlußgrenze von 10.000 - 20.000 Dalton. Hersteller: Union Carbid Corporation, Chicago. Die "Proteinseite" wurde mit 200 µl Membranlösung gefüllt (Proteinkonzentration ca. 500 µg/100 µl), die komplementäre Halbzelle enthielt die in 200 µl gelösten markierten Sideramine. Nach drei Stunden Inkubation bei 10 Upm und 20° C wurden beide Halbzellen auf ihre Radioaktivität untersucht.

2.17. Sauerstoffbestimmung

Die Sauerstoffbestimmung erfolgte in einer Clark-Elektrode der Firma Bachofer, Reutlingen. Der Nullwert für Sauerstoff wurde mit Natriumdithionit, der Maximalwert mit luftgesättigtem Wasser ermittelt.

2.18. Proteinbestimmung

Es wurde die Methode von Lowry (16) mit Rinderserumalbumin als Referenzsubstanz benutzt.

2.19. Rechnerische Behandlung der kinetischen Meßdaten

Die kinetischen Meßdaten wurden mit einem Computerprogramm mathematisch ausgewertet und graphisch in verschiedenen Diagrammarten ausgegeben. Das eigens dafür erstellte Rechenprogramm basiert auf der Regressionsanalyse, welche in eine beliebige Anzahl von Punkten die optimale Gerade legt. Da diese Fehlerrechnung selbst nicht fehlerfrei arbeitet, wurde noch zusätzlich die Möglichkeit der Gewichtung eingebaut. Werden die Meßdaten in ein doppeltreziprokes Diagramm eingetragen, finden z.B. die Werte mit fortschreitender x-Größe weniger Gewicht in der Berechnung der Geraden; hier wurde dann eine Gewichtung gemäß den x-Werten durchgeführt:

x-Wert	$1 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$10 \cdot 10^{-6}$	...
Gewichtung	1	3	5	10	...

Das Ergebnis jeder Regressionsanalyse sind die Werte der Geraden, A und B, sowie die durchschnittliche, prozentuale Abweichung der einzelnen Werte von der optimalen Geraden. Diese durchschnittliche, prozentuale Abweichungsgröße (in Y-Richtung) ist für die Beurteilung des Versuchs von Bedeutung.

Folgende Diagramme sind durch das Programm erstellbar: Doppeltreziprok (Lineweaver-Burk), Y-reziprok (Dixon-Webb), X/Y:X (Scatchard), Y/X-Diagramm (Gerade) sowie ein Diagramm, welches in die Meßdaten die errechnete, optimale Hyperbel einzeichnet.

Ferner verfügt das Programm noch über die Möglichkeit, die eingegebenen Werte auf einen externen Speicher (Magnetplatte) zu übertragen, um im Bedarfsfalle wieder in das Programm eingelesen werden zu können.

3. ERGEBNISSE

3.1. Fehlerbestimmung der kinetischen Versuche (2.10.)

Zur Beurteilung der kinetischen Meßwerte und deren mathematischen Bearbeitung war es wichtig, die experimentellen Fehlergrößen zu bestimmen. Hierzu wurden bei vier verschiedenen Coprogenkonzentrationen jeweils fünf Aufnahmeraten gemessen. Bestimmt wurde dann der Mittelwert ($\bar{X}$) und die mittlere, prozentuale Standardabweichung (σ).

Tab. 1: Fehlerbestimmung der Siderochrom-Aufnahme-Versuche

Coprogen-konz.	Meßwerte (dpm x 10^6)					$\bar{X}$ (dpmx10^6)	σ (%)
2 µM	1.12	1.20	1.26	1.34	1.03	1.19	9.5
10 µM	0.75	0.78	0.82	0.80	0.80	0.79	2.5
50 µM	0.22	0.29	0.25	0.23	0.25	0.25	10.5
1100 µM	0.140	0.163	0.167	0.163	0.152	0.157	7.0

Um die Fehlerwerte weiter zu minimieren wurde beim Inkubieren im Wasserbad die Upm-Zahl von 100 auf 300 erhöht sowie die Nachspülmenge an Saline verdreifacht (3 mal 20 ml). Auf diese Weise konnte die mittlere prozentuale Abweichung immer deutlich unter 10 % gehalten werden.

3.2. Kinetik der Coprogenaufnahme

3.2.1. Kinetik der Coprogenaufnahme im Eisenmangel

Der ungefähre K_m-Wert der Coprogenaufnahme im Eisenmangel liegt bei 10 µM (12,13,43). Um eine genauere Vorstellung des Mechanismus des Coprogentransports zu erhalten, wurden die

Aufnahmeraten ab Coprogenkonzentrationen von einer Zehnerpotenz unter (1 µM), bis zu einer Zehnerpotenz über (100 µM) dem vorgegebenen K_m-Wert gemessen. Sollte wirklich ein saturierbarer Vorgang vorliegen, müßte er in diesem Meßbereich deutlich zu erkennen sein.

Die Meßpunkte wurden im doppeltreziproken Lineweaver-Burk Diagramm ausgewertet (Abbildung 2). Die Meßpunkte und die aus Abbildung 2 gewonnene optimale Hyperbel, die man für einen saturierbareren Vorgang erhält, sind in einem V/[S]-Diagramm abgebildet (Abbildung 1).

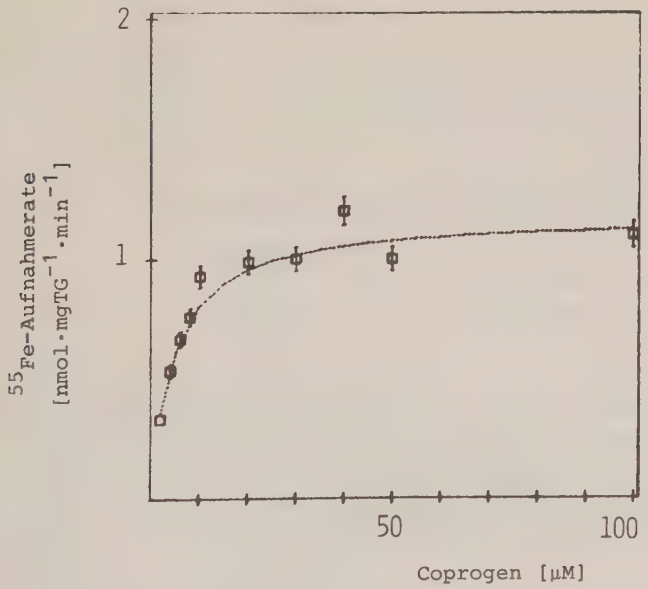


Abb. 1: V/[S]-Diagramm der ^{55}Fe-Aufnahme bei N.crassa ota

16 Stunden in Minimalmedium gewachsene Mycelien wurden auf Papierfilter abgesaugt, gewaschen und in 1 ml Volumen 10 min in Reagenzgläsern mit den angegebenen Chemikalien (300 Upm) inkubiert. Nach Absaugen auf Membranfilter und Nachspülen mit Saline wurde auf Radioaktivität geprüft (2.11., 2.12.). Diese Methode wurde auch für alle weiteren Kinetiken angewandt.

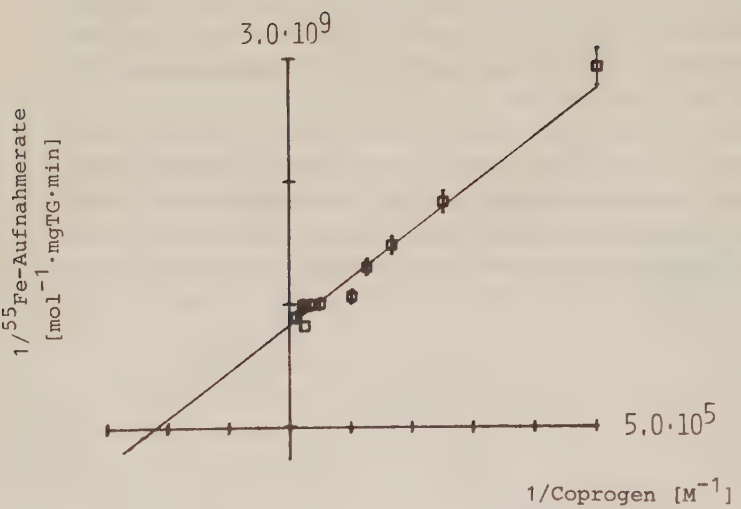
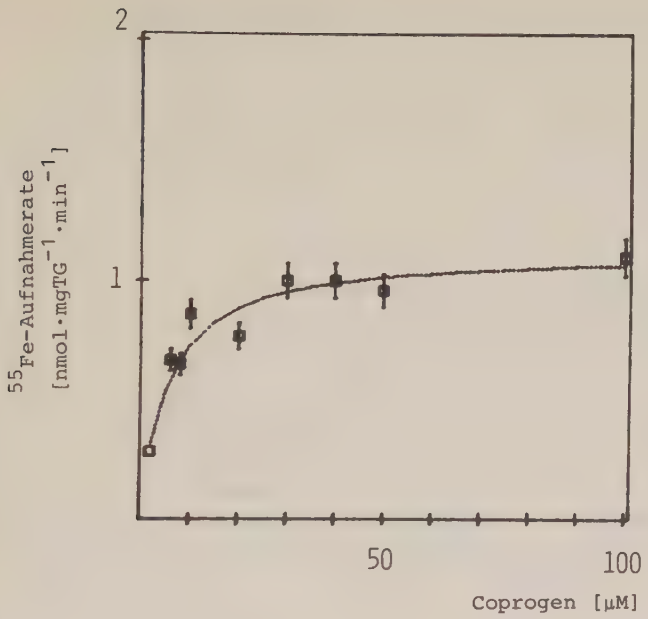


Abb. 2: Lineweaver-Burk Diagramm der ^{55}Fe-Aufnahme

Ergebnis der Berechnungen:
K_m = 5 µM, V_{max} = 1 nm·mgTG^{-1}·min^{-1}, F = 7.2 %

Wie die Abbildungen 1 und 2 verdeutlichen, ist die Coprogenaufnahme im Eisenmangel ein saturierbarer Vorgang. Sie entspricht bei einer durchschnittlichen Abweichung der Punkte von 7.2 % einer rechtwinkligen Hyperbel und liegt damit innerhalb der experimentell bedingten Fehlergrenze.

Um oben erwähnte Aussagen statistisch abzusichern und um die Schwankungen von K_m und V_{max} von Versuch zu Versuch festzustellen, wurde diese Kinetik mehrere Male durchgeführt. Abbildung 3 und 4 geben einen der Wiederholungsversuche wieder.



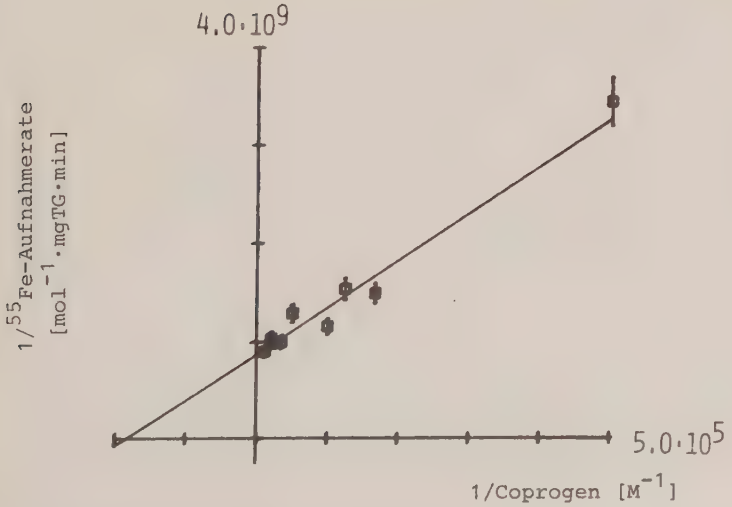


Abb. 3 (oben) und Abb. 4 (unten):

V/[S]-Diagramm und Lineweaver-Burk Diagramm der Aufnahme von [^{55}Fe]-Coprogen

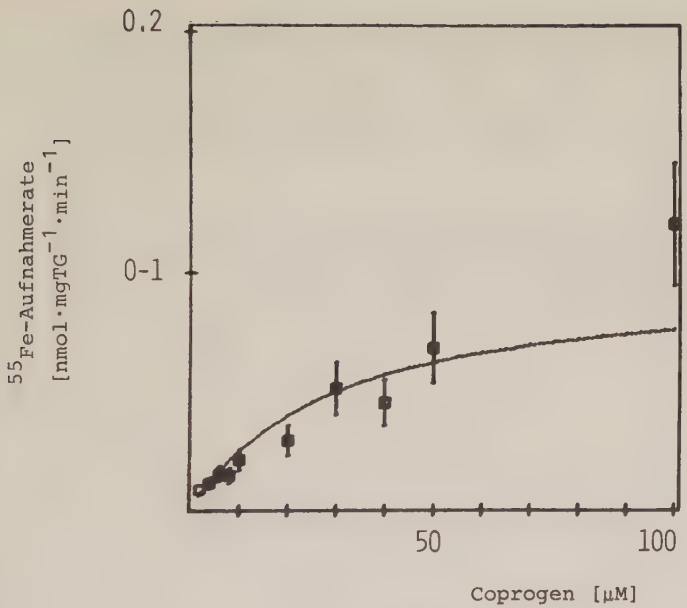
3.2.2. Kinetik der Coprogenaufnahme im Nichteisenmangel

Zur Kinetik der Coprogenaufnahme im Nichteisenmangel wurden die Konidiosporen in 10^{-5} M Coprogen-haltigem Minimalmedium angezogen. Wie Abbildung 5 und 6 zeigen, unterscheiden sich die Kinetiken im Eisenmangel und Nichteisenmangel in zwei Punkten:

1. Die Coprogenaufnahme im Nichteisenmangel ist mit den Gesetzen der Sättigungskinetik nicht zufriedenstellend beschreibbar.

2. Die Aufnahmerate ist um den Faktor 10 geringer als im Eisenmangel.

Abbildungen 5 und 6 zeigen den Versuch, die erhaltenen Meßwerte mit den Gesetzen der Sättigungskinetik zu behandeln.



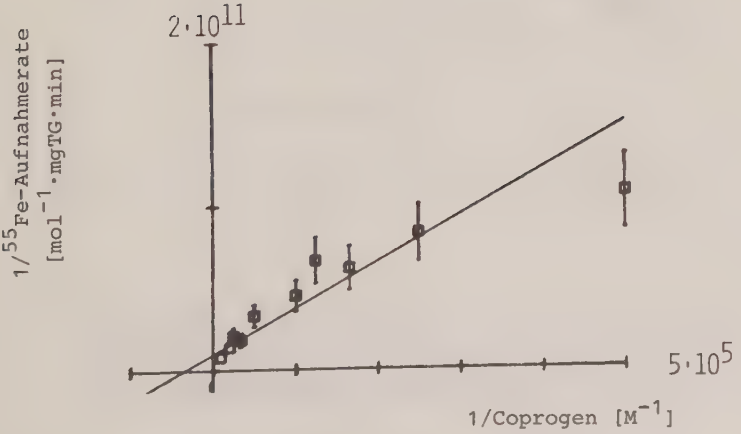


Abb. 5 (oben) und Abb. 6 (unten):
Aufnahme von [^{55}Fe]-Coprogen im Nichteisenmangel mit Lineweaver-Burk Diagramm

Die durchschnittliche, prozentuale Abweichung der Meßpunkte von der optimalen Hyperbel beträgt 25 % und liegt damit über der experimentalen Fehlergrenze. Legt man jedoch eine Gerade durch die Meßpunkte, so ergibt die Regressionsanalyse nur einen Fehlerwert von 8 % (Abbildung 7).

Infolgedessen ergeben die Meßpunkte in Abbildung 5 eine Gerade und im Lineweaver-Burk Diagramm (Abbildung 6) eher eine rechtwinklige Hyperbel.

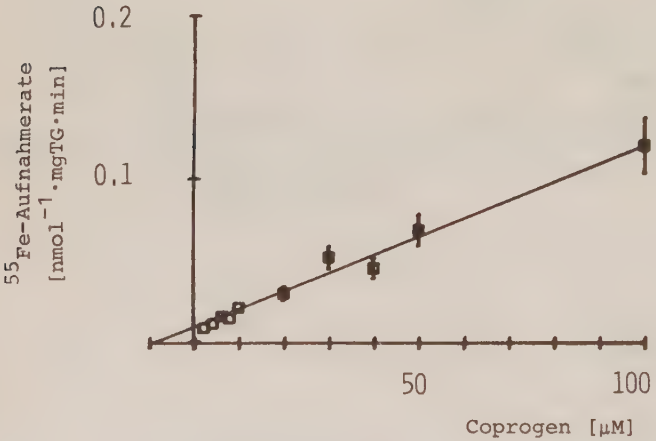
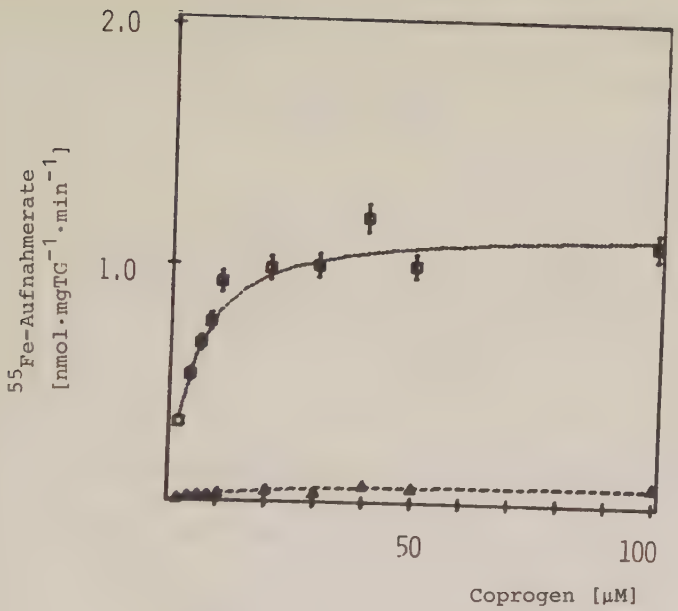


Abb. 7: Coprogenaufnahme im Nichteisenmangel mit der optimalen Geraden

Die um den Faktor 10 unterschiedlichen Aufnahmeraten geben am besten die Diagramme wieder, die sowohl die Eisenmangelwerte als auch die im Nichteisenmangel erhaltenen enthalten (Abbildung 8 und 9).



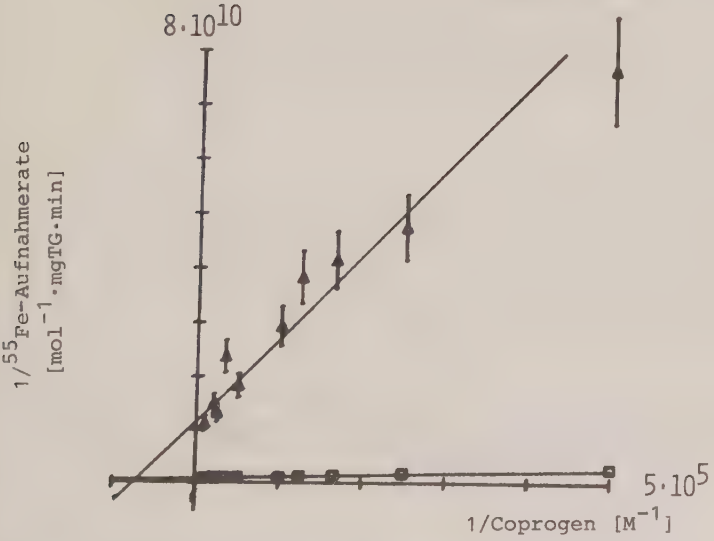


Abb. 8 (oben) und Abb. 9 (unten):
Aufnahme von [^{55}Fe]-Coprogen, □ im Eisenmangel und
Δ Nichteisenmangel

3.3. Kinetik der Hemmung des Coprogentransports

3.3.1. Coprogentransporthemmung im Eisenmangel

3.3.1.1. Hemmstoff: Ferrirubin

Ferrirubin ist ein effektiver Hemmstoff des Coprogentransports (43,44). Um näheren Einblick in die Wirkungsweise des Eingriffs zu bekommen, bietet sich eine Hemmkinetik an. In vorliegender Arbeit wurden hierfür zwei Methoden bzw. Diagramme angewandt:

1. Lineweaver-Burk

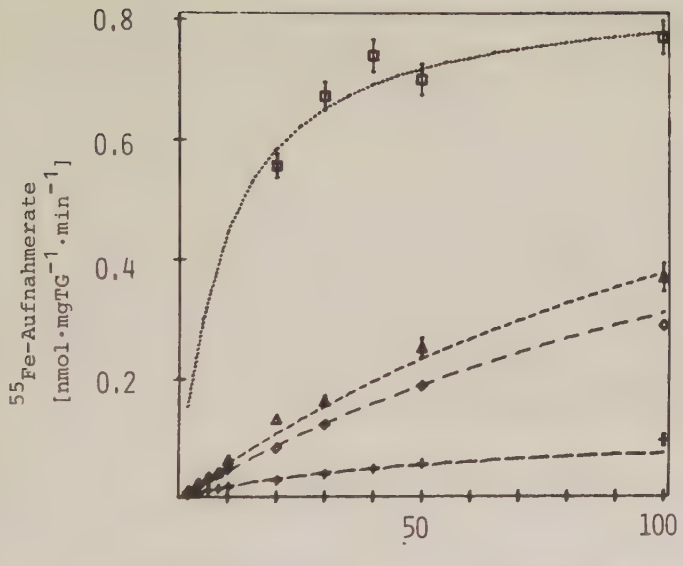
   Bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen werden Substratkonzentrationsvariationen durchgeführt und die Meßpunkte in das Lineweaver-Burk Diagramm eingetragen. Die Veränderungen von K_m und V_{max} bei den unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen zeigen die Art der Hemmung an. Aus den K_m- und V_{max}-Werten der gehemmten und der ungehemmten Hyperbeln läßt sich die Hemmungskonstante K_i bestimmen.

2. Dixon-Webb

   Bei verschiedenen Substratkonzentrationen werden Hemmstoffkonzentrationsvariationen durchgeführt und in ein Y-reziprokes Diagramm eingetragen. Der absolute X-Wert des Schnittpunkts der Geraden entspricht dem numerischen Wert von K_i.

Das Ferrirubin wurde dem Bestand des Institus für Biologie II entnommen und nach einer Konzentrationsbestimmung direkt für nachfolgenden Hemmversuch angewandt.

3.3.1.1.1. Kinetik der Ferrirubinhemmung des Coprogentransports im Lineweaver-Burk Diagramm



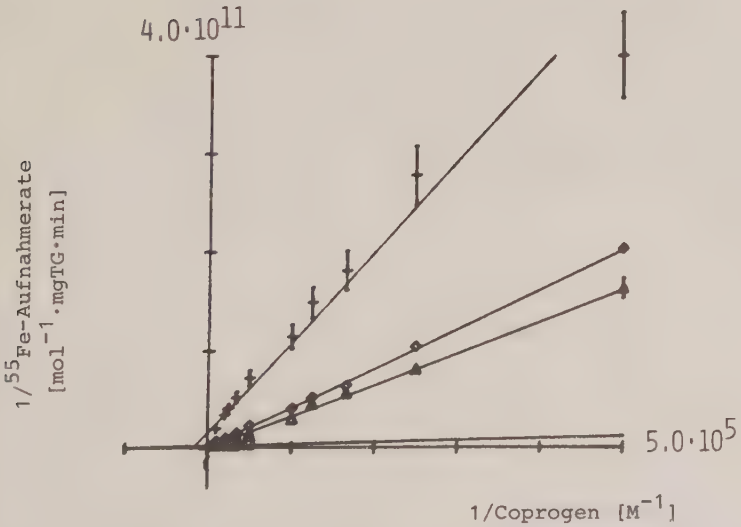


Abb. 10 (oben) und Abb. 11 (unten):

Kinetik der Coprogeneisenaufnahme bei unterschiedlichen Ferrirubinkonzentrationen

□ ohne Ferrirubin, Δ 2 µM Ferrirubin, ◇ 6 µM Ferriburin,

+ 20 µM Ferrirubin

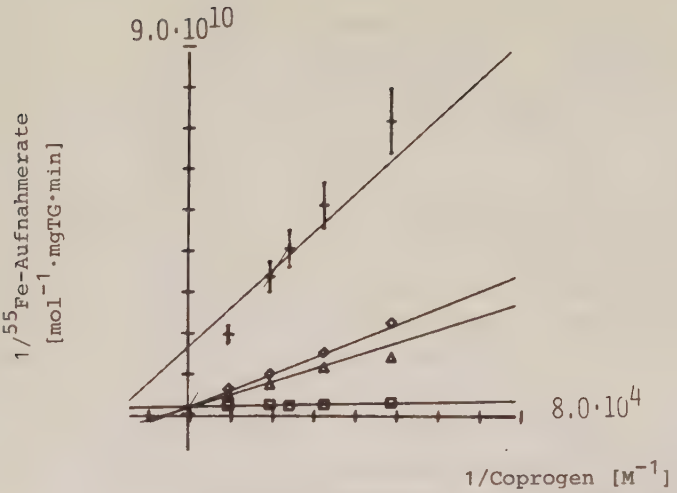


Abb. 12: Lineweaver-Burk Diagramm der Ferrirubinhemmung von S. 21 mit den vier höchsten Coprogenkonzentrationen (Ausschnitt aus Abb. 11)

Tab. 2: Ergebnisse der Berechnungen aus nachfolgendem Lineweaver-Burk Diagramm

Ferrirubin-konz.	K_m	V_{max}·mgTG^{-1}	F	K_i
0	8 µM	0.824 nmol	3.7 %	-
2 µM	0.15 mM	0.878 nmol	6.5 %	0.14 µM
6 µM	0.18 mM	0.820 nmol	2.7 %	0.33 µM
20 µM	(53.2 µM)	(0.058 nmol)	18.6 %	(0.47 µM)

Wie aus den Abbildungen 10 - 12 zu erkennen ist, besitzt die Ferrirubinhemmung der Coprogenaufnahme eindeutig kompetitiven Charakter, d.h. sowohl Ferrirubin als auch Coprogen konkurrieren um dieselbe Stelle am Sideramintransportsystem.

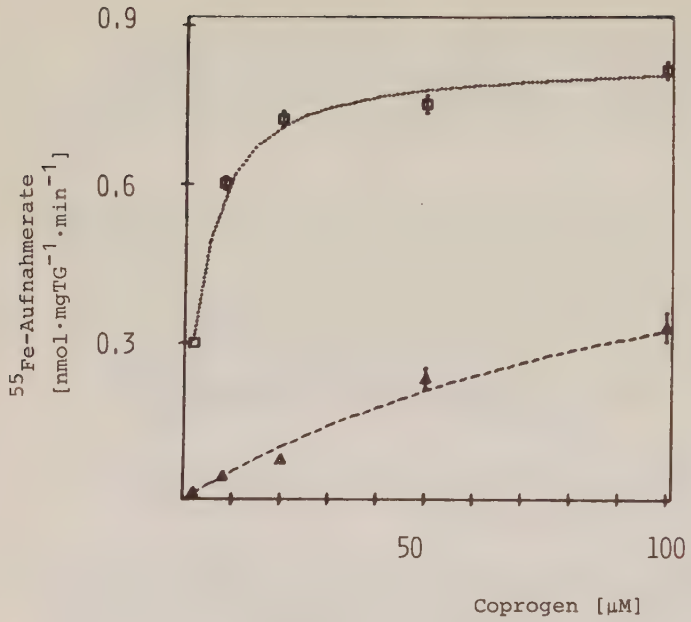
Die Hemmungskinetiken mit 2 und 6 µM Ferrirubin sind im V_{max}-Wert untereinander und mit der ungehemmten Aufnahmekinetik identisch. Der K_m-Wert steigt mit der Hemmstoffkonzentration an, somit sind alle Kriterien einer kompetitiven Hemmung erfüllt.

Bei einer Ferrirubinkonzentration von 20 µM tritt offensichtlich Totalhemmung der Coprogenaufnahme ein. Die Versuchswerte entsprechen, im Gegensatz zu den mit niedrigeren Hemmstoffkonzentrationen erhaltenen, nicht mehr den Gesetzen der Sättigungskinetik. Die verbliebene Restaufnahme ist vielmehr vergleichbar mit der Coprogenaufnahme im Nichteisenmangel (3.2.2.).

Den K_i-Wert der Ferrirubinhemmung der Coprogenaufnahme kann man gemittelt mit 0.2 µM angeben.

Da das entnommene Ferrirubin in der Dünnschichtchromatographie (2.8.) Verunreinigungen anderer Sideramine aufwies, und um oben beschriebene Aussagen statistsich zu untermauern, wurde das Ferrirubin, wie in 2.6. beschrieben, nachgereinigt und für eine weitere hemmungskinetische Untersuchung benutzt.

Abbildungen 13 und 14 geben die Diagramme oben beschriebener Hemmungskinetik wieder.



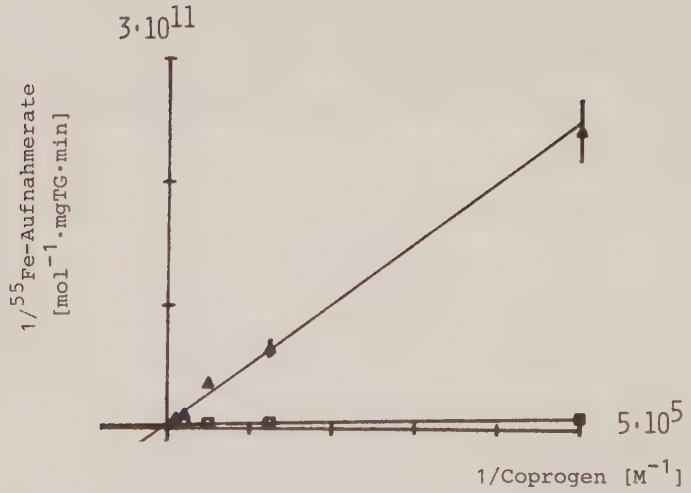


Abb. 13 (oben) und Abb. 14 (unten):
Kinetik der Coprogenaufnahme, □ ohne, Δ mit 2 µM Ferrirubin

Tab. 3: Ergebnisse der Hemmungskinetik mit nachgereinigtem Ferrirubin

Ferrirubin-konz.	K_m	V_{max} ($mgTG^{-1}min^{-1}$)	F	K_i
0 µM	4 µM	0.99 nmol	4.04 %	-
2 µM	0.1 mM	0.90 nmol	8.2 %	0.06 µM

Formel der K_i-Bestimmungen im Lineweaver-Burk Diagramm:

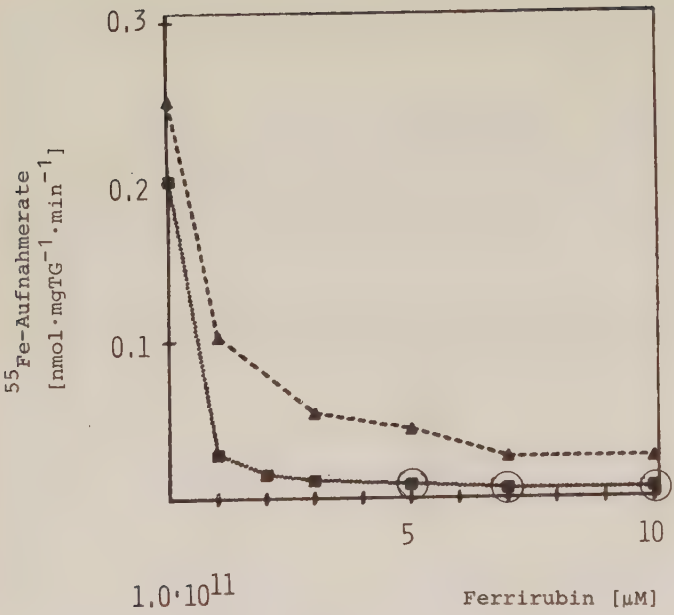
$$K_i = \frac{[I]}{\frac{\frac{K_{mi}}{V_{mi}}}{\frac{K_m}{V_m}} - 1}$$

3.3.1.1.2. Kinetik der Ferrirubinhemmung des Coprogentransports im Dixon-Webb Diagramm

Zur Überprüfung des K_i-Wertes der Ferrirubinhemmung der Coprogenaufnahme wurde das Verfahren von Dixon-Webb angewandt, nach welchem eine direkte Bestimmung des Hemmwertes aus dem Diagramm möglich ist.

Dazu wurden bei 8 µM und bei 50 µM Coprogen-Grundkonzentrationen Ferrirubinkonzentrationen von 1 - 10 µM getestet.

Bei der Coprogenkonzentration 8 µM erzielten die drei stärksten Ferrirubinkonzentrationen Totalhemmung mit dem auf Seite 25 beschriebenen Effekt der nicht mehr möglichen Vereinbarkeit mit sättigungskinetischen Gesetzen (Background der Versuchseinrichtung?). Diese Aufnahmewerte erwiesen sich im Dixon-Webb Diagramm als zu hoch und wurden durch eine weitere, kleinere Ferrirubinkonzentration ersetzt (2 µM). Siehe hierzu Abbildung 15.



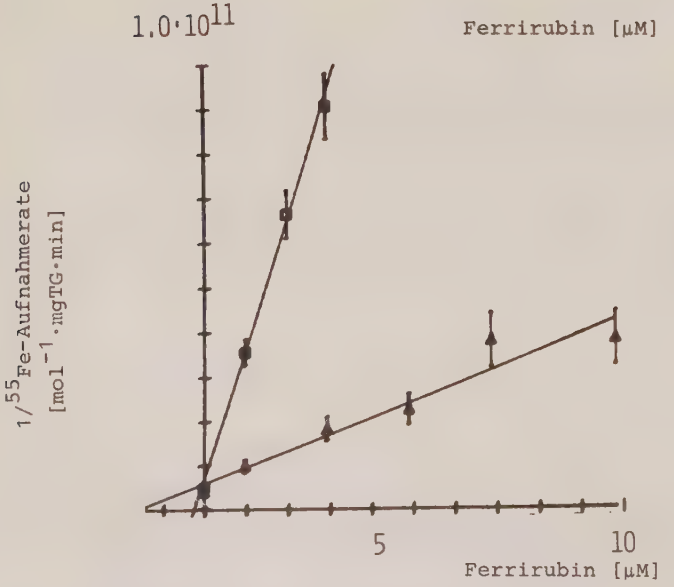


Abb. 15 (oben) und Abb. 16 (unten):
Kinetik der Hemmung der Aufnahme von [^{55}Fe]-Coprogen durch Ferrirubin mit Dixon-Webb Diagramm

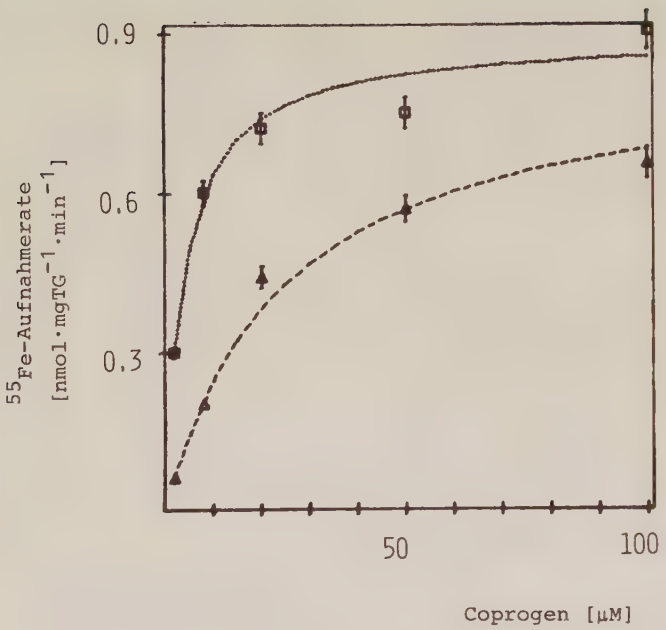
Wie in Abbildung 16 ersichtlich, ist es auch bei einer Verkleinerung des Ausschnitts nur unbefriedigend möglich, die X-Größe des Schnittpunktes der zwei Geraden graphisch zu bestimmen. Sowohl die Schnittpunkte der Geraden eines Diagramms mit den Koordinaten als auch untereinander, werden durch das Computerprogramm berechnet und ausgegeben.

Schnittpunkt der zwei Geraden: $0.7 \cdot 10^{-8} / 0.6 \cdot 10^{10}$
K_i-Wert der Ferrirubinhemmung: 0.07 µM
Abweichungen der Geraden
8 µM Coprogen: 8.2 %
50 µM Coprogen: 11.3 %

3.3.1.2. Hemmstoff: Coprogen-Dextran

Coprogen-Dextran wurde, wie nach 2.10.4. beschrieben, hergestellt. Coprogen wurde auf diese Weise mit einem Spacer an ein Dextran-Molekül gebunden (MG von Dextran = $0.5 \cdot 10^6$). Ähnlich wie bei Ferrirubin dürfte bei Coprogen-Dextran eine Anlagerung an das Transportsystem zwar möglich sein, die Transportrate jedoch gegen null streben.

Abbildung 17 und 18 zeigen die Ergebnisse der hemmkinetischen Versuche mit Coprogen-Dextran.



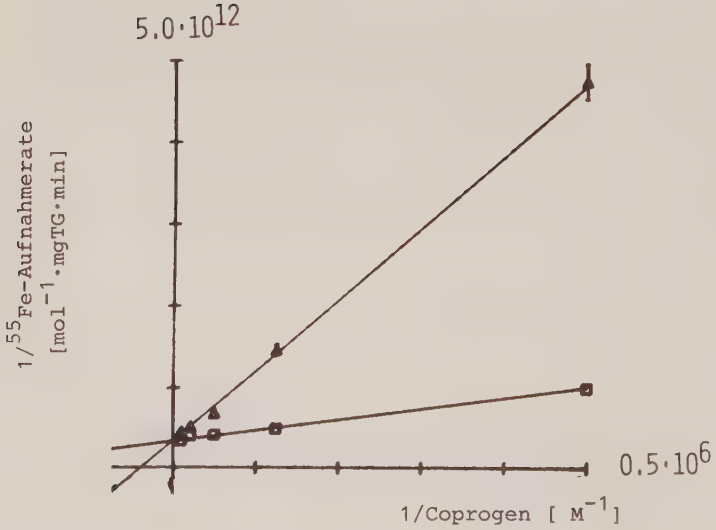


Abb. 17 (oben) und Abb. 18 (unten):

Hemmung der Coprogeneisenaufnahme durch Coprogen-Dextran

□ ohne Coprogen-Dextran, Δ 20 µM Coprogen-Dextran

Ergebnis der Berechnung:

K_i der Coprogen-Dextranhemmung: 4 µM

Auch bei der Hemmung durch Coprogen-Dextran erhält man kinetische Meßdaten, welche eindeutig den kompetitiven Charakter dieser Hemmung unterstreichen.

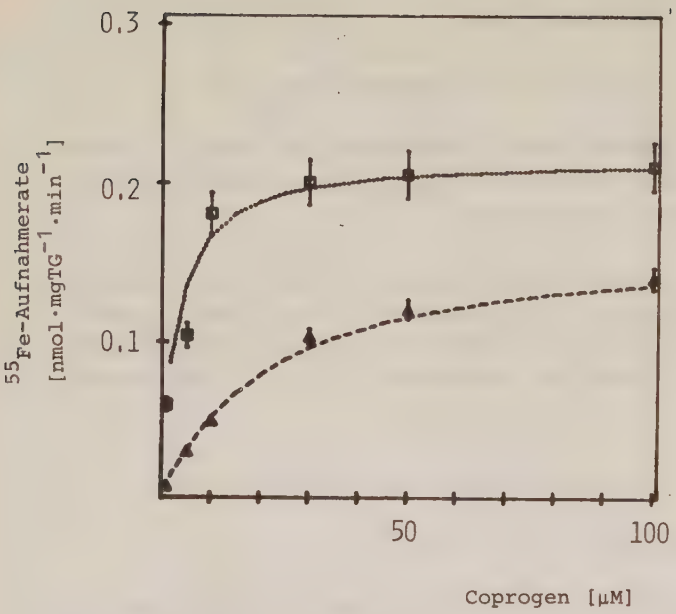
Da der K_i-Wert einer Hemmung mit dem K_s-Wert einer enzymatischen Reaktion, bzw. eines Transportvorgangs, vergleichbar ist, erscheint auch der K_i-Wert vorliegender Hemmung erklärbar (K_i der Coprogen-Dextranhemmung $\sim$ K_m des Coprogentransports).

3.3.1.3. Hemmstoffe: 11C und F11C

Die Hemmstoffe wurden wie in 2.10.5. und 2.10.6. beschrieben hergestellt. Bei beiden Kopplungsprodukten könnte eine Anlagerung an das Transportsystem möglich sein. Ein Transport ins Zellinnere ist wegen der Molekülgröße der Kopplungsprodukte jedoch kaum vorstellbar.
Eine Hemmung des Coprogentransports mit 11C und F11C sollte demnach erwartet werden.

Das Kopplungsprodukt F11C eröffnet außerdem die Möglichkeit der elektronenmikroskopischen Lokalisierung der Anlagerung. (Ferritin läßt sich wegen seines hohen Molekulargewichts von 400.000 und der damit einhergehenden Molekulargröße elektronenmikroskopisch abbilden. Außerdem besitzt Ferritin aufgrund seines hohen Eisengehaltes für Elektronenstrahlen eine schwere Durchdringbarkeit, welche sich positiv auf den Kontrast der Molekülabbildung auswirkt.)

Abbildung 19 und 20 beinhalten die Wirkung von 11C, die Abbildungen 21 und 22 die Wirkung von F11C.



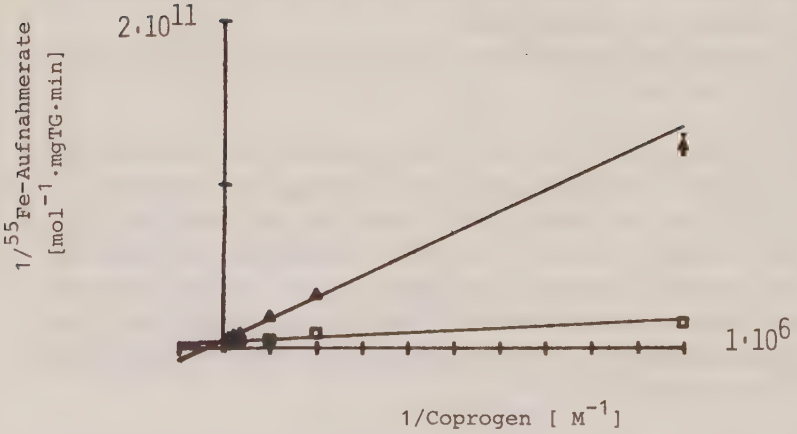
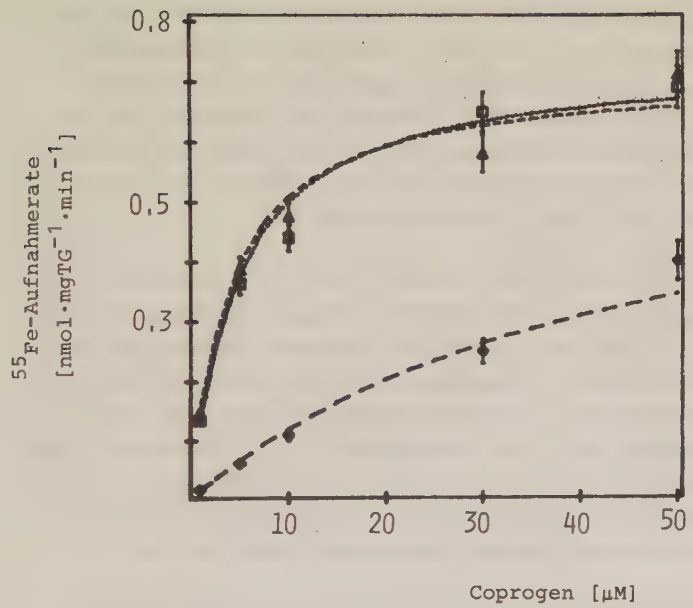


Abb. 19 (oben) und Abb. 20 (unten):

Hemmung des Coprogentransports durch 11C mit Lineweaver-Burk Diagramm □ ohne 11C, Δ 20 µM 11C



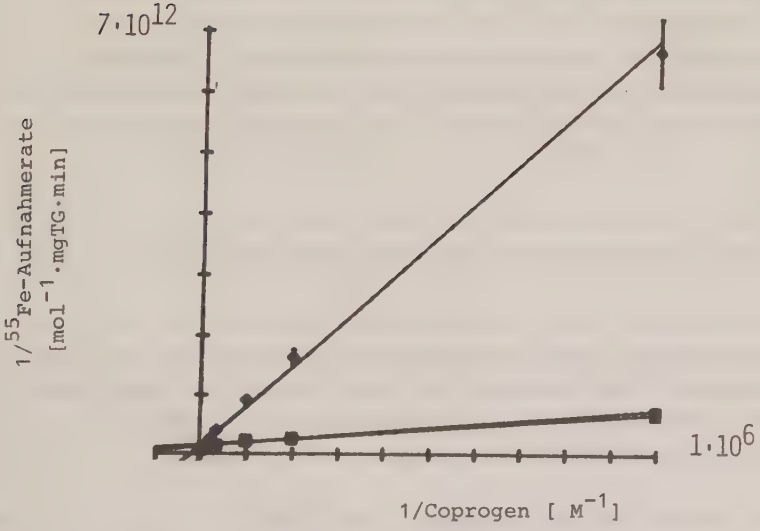


Abb. 21 (oben) und Abb. 22 (unten):

Hemmung des Coprogentransports durch F11C mit Lineweaver-Burk Diagramm □ohne F11C, ◇20 µM F11C, Δ 20 µM Ferritin

Beide Coprogen-B-Kopplungsprodukte, 11C und F11C, zeigen eindeutig eine kompetitive Hemmcharakteristik. Als Kontrolle der F11C-Hemmung wurde der Coprogentransport in Gegenwart unbehandelten Ferritins gemessen. Unbehandeltes Ferritin besitzt keine hemmende Wirkung hinsichtlich der Aufnahme von Coprogen (Abb. 21 und 22). Die K_i-Werte für 11C und F11C liegen in der Größenordnung von K_M der Coprogenaufnahme.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen bei Inkubation mit dem Kopplungsprodukt F11C grannuläre Anlagerungen an der Zellwandaußenseite. Die elektronenoptische Dichte deutet auf Ferritin hin. Der Spacer im Kopplungsprodukt F11C zwischen Ferritin und Coprogen, die 11-Amino-undecansäure, ist auf jeden Fall nicht in der Lage, die Entfernung Zellwandaußenseite und Cytoplasmamembran (~60 Å) zu überbrücken. Somit ist in diesem Falle eine Anlagerung des gekoppelten Siderochroms an ein Transportsystem in der Cytoplasmamembran nicht möglich.

Da die Lokalisierung des Siderochrom-Transportsystems nicht Thema dieser Arbeit ist, wird auf diese Problematik nicht näher eingangen, die Spekulation eines weiteren, in der Zellwand gebundenen Transportsystems, vergleichbar dem bakteriellen Siderochrom-Transportsystem, wäre jedenfalls interessant.

3.3.2. Coprogentransporthemmung im Nichteisenmangel

Um die Restaufnahme von Coprogen im Nichteisenmangel näher zu charakterisieren, wurden Hemmversuche mit Ferrirubin und eisenversorgten Mycelien durchgeführt. Hierzu wurde die Ferrirubinkonzentration gewählt, bei der im Eisenmangel Totalhemmung der Coprogenaufnahme eintrat (20 µM).

Ergebnis dieses Hemmversuchs siehe Abbildung 26.

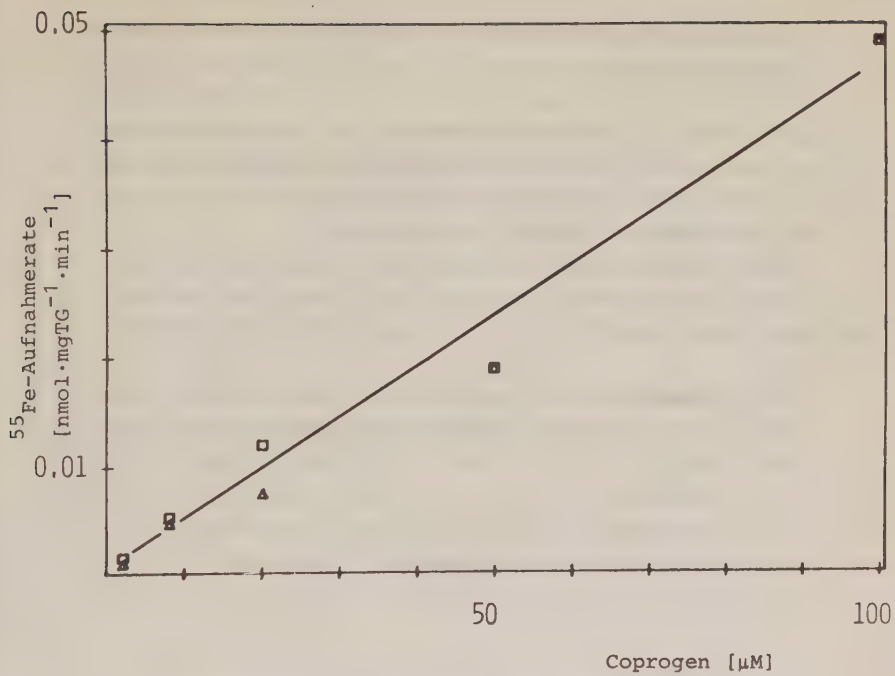


Abb. 26: Ferrirubinhemmung der Coprogenaufnahme im Nichteisenmangel
□ ohne Ferrirubin, Δ 20 µM Ferrirubin

(Die Meßpunkte mit den zwei höchsten Coprogenkonzentrationen sind nahezu identisch und liegen deshalb übereinander.

Während bei einer Hemmstoffkonzentration von 20 µM im Eisenmangel Totalhemmung auftritt, zeigt die Coprogen-Aufnahmerate von eisenversorgten Mycelien keine nennenswerte Abschwächung.

Es stellt sich hier die Frage, ob es sich um ein zweites Aufnahmesystem für Coprogen handelt oder ob diese Aufnahmeraten unspezifischer Natur, also als Background der Versuchsdurchführung zu verstehen sind.

3.4. Kinetik der Ferrirubinaufnahme im Eisenmangel und im Nichteisenmangel

Wie die Kinetik der Ferrirubinhemmung der Coprogenaufnahme zeigt, besitzt Ferrirubin eine starke Affinität zu dem Coprogentransportsystem. Zur Quantifizierung dieser Interaktion wurden nachfolgende Versuche durchgeführt.

Zur Berechnung der Versuchsergebnisse wurden zwei Verfahren zur Anwendung gebracht:

1. zur Bestimmung des K_M-Wertes und der Größe von V_{max} das bereits beschriebene Lineweaver-Burk Diagramm,

2. zur Bestimmung von K_S und der Menge an gebundenem Ferrirubin das Diagramm nach Scatchard.

3.4.1. Kinetik der Ferrirubinaufnahme im Lineweaver-Burk Diagramm

Zur Erstellung einer Ferrirubin-Sättigungskinetik wurden die eingesetzten Konzentrationen gemäß dem beobachteten K_i-Wert gewählt (0.005 - 1.0 µM Ferrirubin).

Die Abbildungen 27 und 28 sowie Tabelle 4 zeigen die Ergebnisse der Ferrirubin-Sättigungskinetiken im Eisenmangel und im Nichteisenmangel.

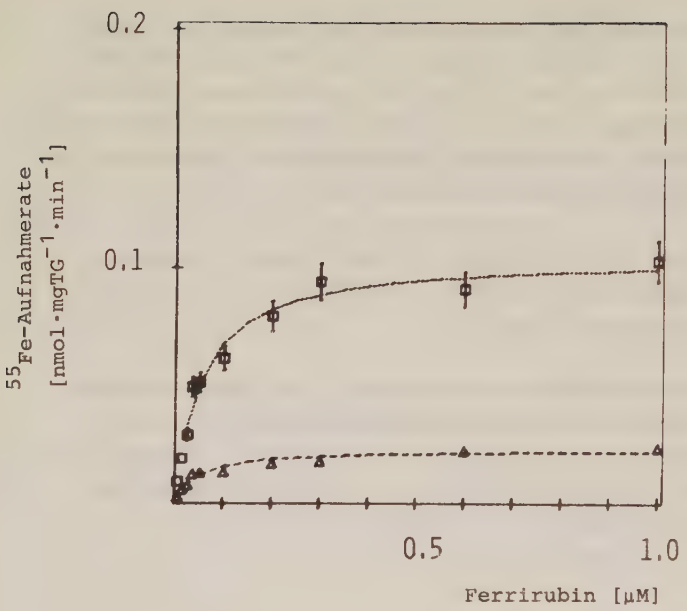
Tab. 4: Ergebnisse der Berechnungen

Mycelienzustand	K_M	V_{max} ($mgTG^{-1}$)	F
Eisenmangel	0.05 µM	100 pmol	8.4 %
Nichteisenmangel	0.04 µM	24 pmol	9.34 %

Im Eisenmangel ist die Transportrate im Vergleich zur Coprogenaufnahme sehr gering. Die Ferrirubinaufnahme im Eisenmangel erreicht nur ein Zehntel der Coprogenaufnahme und liegt damit in der Größenordnung der Coprogenaufnahme im Nichteisenmangel. Man kann deshalb sagen, daß Ferrirubin zwar angelagert wird, aber nicht oder kaum transportiert.

Die Anlagerung des Ferrirubins an das Sideramintransportsystem zeigt einen 100fach kleineren und damit affineren K_M-Wert als die Coprogenaufnahme.

Im Gegensatz zum Coprogentransport zeigt die Ferrirubinaufnahme im Nichteisenmangel Sättigungsverhalten und ist in V_{max} um ungefähr den Faktor fünf geringer. Die K_M-Werte sind vergleichbar und deuten darauf hin, daß hier die gleichen Transportsysteme interaktiv tätig sind.



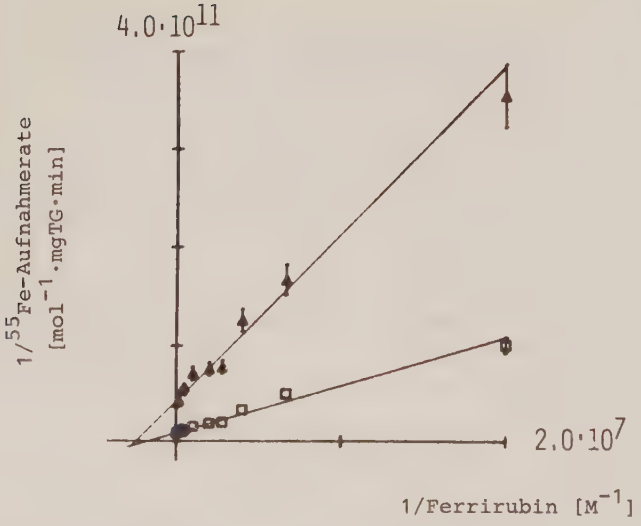


Abb. 27 (oben) und Abb. 28 (unten):
Ferrirubinaufnahme und Lineweaver-Burk Diagramm
□ im Eisenmangel und im Δ Nichteisenmangel

3.4.2. Zeitabhängige Aufnahme von Ferrirubin

Um die Interaktion Ferrirubin - Siderochromtransportsystem näher zu charakterisieren, wurde eine zeitabhängige Ferrirubinaufnahmestudie erstellt. Es zeigte sich hierbei, daß die geringen Ferrirubin-Transportraten schon innerhalb einer Minute zustande kommen.
Vergleiche mit zeitabhängigen Coprogenaufnahmestudien (Abb. 34) zeigen den unterschiedlichen Charakter dieser Aufnahmevorgänge. Es scheint sich im Falle des Ferrirubins tatsächlich nur um eine Anlagerung des Siderochroms an das Transportsystem zu handeln, während beim Coprogen, wie es die Kinetik und Quantität des Transports zeigt, eine Aufnahme ins Zellinnere vorliegt.

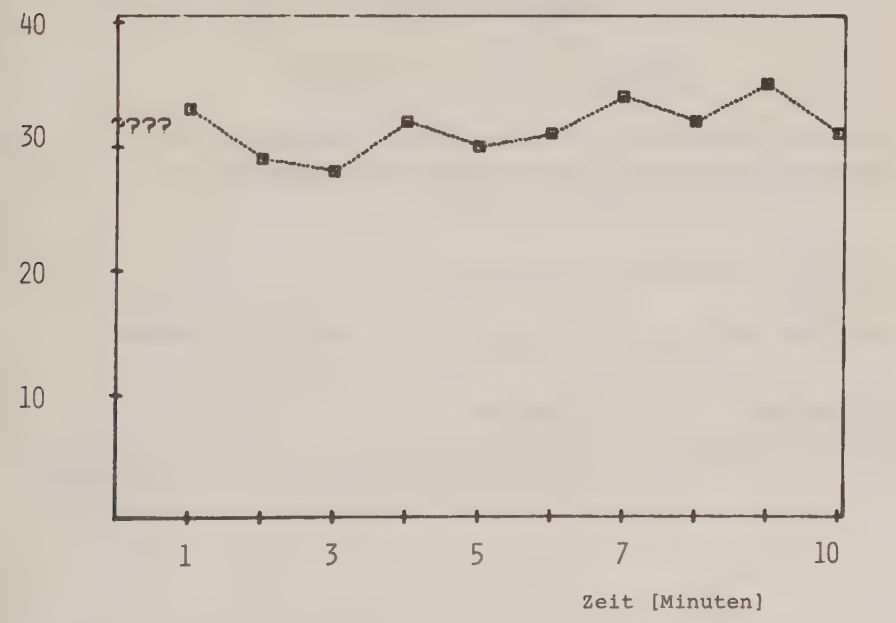


Abb. 29: Zeitabhängige Aufnahme von 1.0 µM [^{55}Fe]-Ferrirubin

16 Stunden in Minimalmedium angezogene Mycelien von N.crassa wurden auf Papierfilter abgesaugt, mit Minimalmedium gewaschen. 10 ml der in Minimalmedium + Glukose resuspendierten Mycelien wurden im 20 ml Erlenmeyerkolben mit 1.0 µM ^{55}Ferrirubin geschüttelt. Im Minutentakt wurden jeweils 1 ml entnommen; die Radioaktivität wurde wie in 2.12. beschrieben bestimmt.

3.4.3. Kinetik der Ferrirubinaufnahme im Scatchard-Diagramm

Das Scatchard-Diagramm wird in der Enzymatik meist dazu benutzt, die Menge an Enzym sowie den K_S-Wert zu bestimmen. Dazu muß man die Menge an gebundenem und freiem Substrat bestimmen können. Geht man im Falle des Ferrirubins von der Annahme aus, daß nur eine Anlagerung und kein Transport stattfindet, so sind diese zwei Werte des Substratzustandes bestimmbar. Trägt man auf der X-Achse den Quotienten aus gebundenem zu freiem Anteil, auf der Y-Achse den gebundenen Anteil auf, so hat die durch die Meßpunkte gelegte Gerade folgende Charakteristika:

$$\text{Steigung} = 1/K_S$$

$$\text{X-Abschnitt} = \text{gebundener Anteil}$$

Abbildung 30 gibt die Anwendung dieses Diagramms auf die Interaktion Ferrirubin - Sideramintransportsystem wieder.

Tab. 5: Ergebnisse der Berechnungen

Mycelzustand	K_S	Ferrirubin gebunden ($pmol \cdot mgTG^{-1}$)
Eisenmangel	0.048 µM	107
Nichteisenmangel	0.052 µM	24

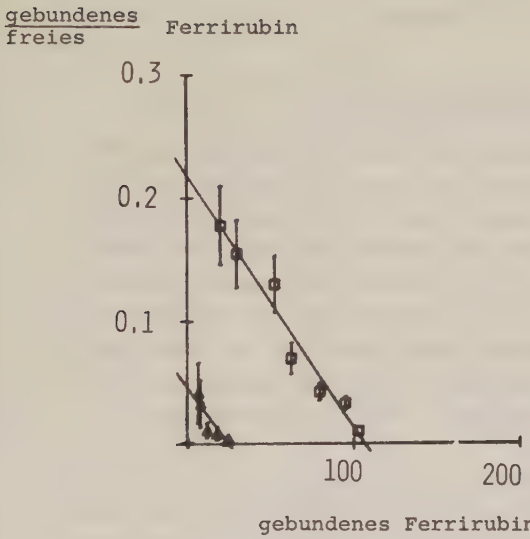


Abb. 30: Scatchard-Diagramm der Ferrirubinanlagerung im □ Eisenmangel, im Δ Nichteisenmangel

Nach der Formel:

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K_B \quad (K_B = \text{Bindungskonstante } [1/K_s])$$

erhält man die Änderung der freien Enthalpie (unter Standardbedingungen) für die Ferrirubinanlagerung an die Transportstellen der Membran:

$$\Delta G^{\circ} = - 8.314 \cdot 298 \cdot \ln 2 \cdot 10^{7}$$
$$\Delta G^{\circ} = 42 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

3.5. Energetik des Sideramintransports

3.5.1. Hemmung des Coprogentransports durch KCN und N_2

Zur Kontrolle des Sauerstoffgehalts des Inkubationsmediums bzw. des Sauerstoffverbrauchs der keimenden Sporen, wurde nachfolgender Versuch in einer Clark-Elektroden-Kammer durchgeführt. In der Clark-Elektroden-Kammer befinden sich zwei Silberelektroden, an denen die Spannung des Redoxpotentials des Sauerstoffs angelegt ist. Zwischen der auf den Sauerstoffgehalt zu untersuchenden Lösung und den Elektroden befindet sich eine gesättigte KCl-Lösung; die Kompartimentierung der beiden Lösungen übernimmt eine Teflon-Membran.

Da der Sauerstoffbedarf keimender Neurosporasporen relativ hoch ist, konnte der Sauerstoffgehalt in der Elektrode trotz maximalem Rühren und größtmöglichem Rührer während der 10minütigen Inkubation nicht konstant gehalten werden. Die kinetischen Meßwerte sind deshalb quantitativ nur bedingt mit anderen Messungen vergleichbar.

Wie in Abbildung 31 ersichtlich, tritt bei Zugabe von 1 mM KCN nach 3 Minuten eine fast vollständige Hemmung der Atmung ein. Die Inkubationszeit wurde deshalb bei den Sideraminaufnahmeversuchen auf drei Minuten festgelegt.

Die Begasung mit Stickstoff wurde bis zur Erreichung des O_2-Minimums fortgesetzt.

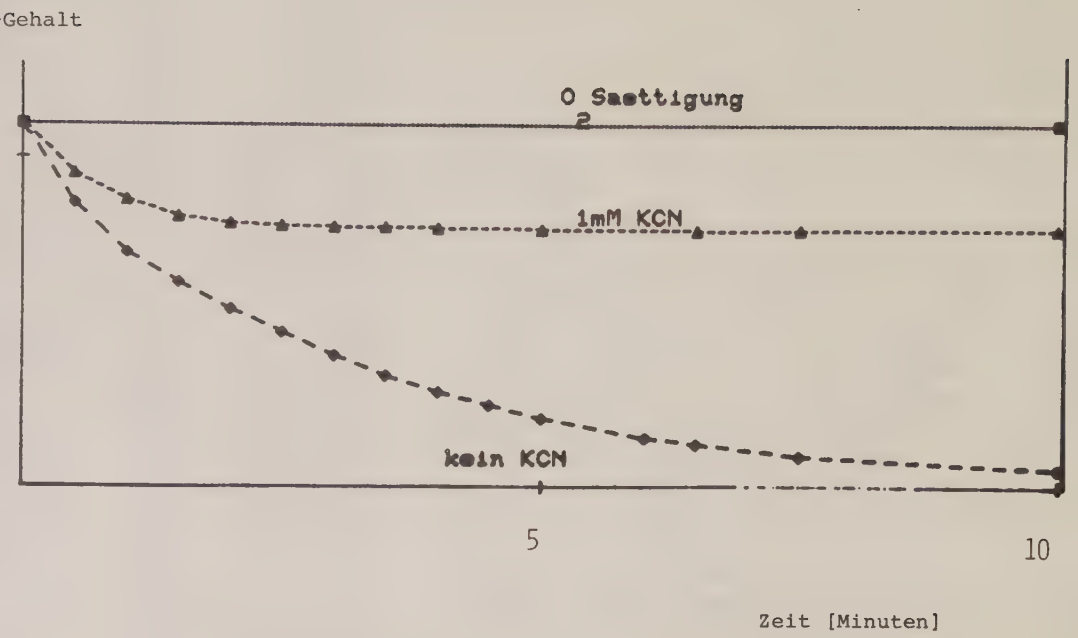


Abb. 31: Sauerstoffverbrauch junger Mycelien (Neurospora crassa arg-5 ota aga) gemessen mit der Clark-Elektrode

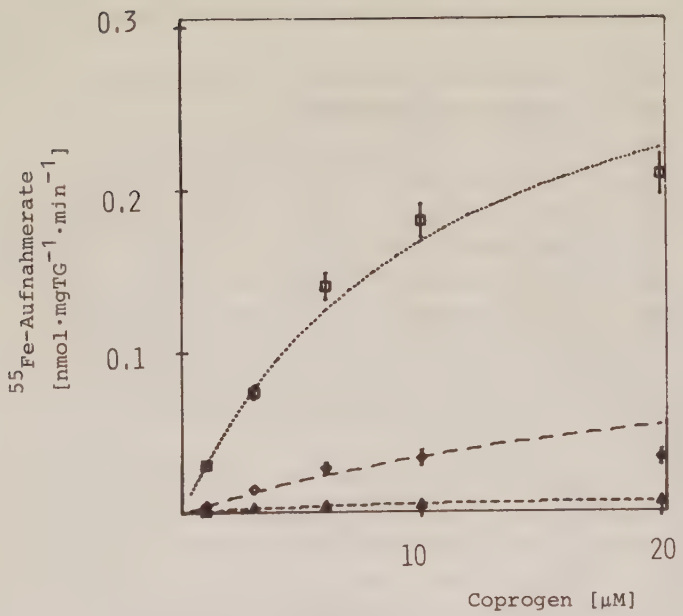


Abb. 32: Hemmung der Coprogenaufnahme
□ ohne KCN, Δ mit 1 mM KCN, ◇ bei Begasung mit N_2

Nach Absaugen der 16 Stunden in Minimalmedium gewachsenen Mycelien auf Papierfilter und Waschen mit Saline, erfolgte die Inkubation der Keimschläuche in der Clark-Elektrode mit den angegebenen Bedingungen. Der Sauerstoffverbrauch wurde während der gesamten Inkubationszeit beobachtet.

Wie aus Abbildung 32 ersichtlich, tritt bei einer KCN-Konzentration von 1 mM eine totale Hemmung der Coprogenaufnahme ein.

Auch Begasen mit N_2 führt zu einer deutlichen Abnahme der Aufnahmerate, daraus kann geschlossen werden, daß die Aufnahme von Coprogen einer funktionstüchtigen Atmungskette bedarf.

3.5.2. Ferrirubinanlagerung mit und ohne KCN

Ferrirubin wird bis zu einer Konzentration von ca. 2 µM nicht oder kaum transportiert, wohl aber mit einer hohen Affinität angelagert.

Durch Zugabe von KCN kann nun geprüft werden, ob der Anlagerungsvorgang selbst energieabhängig ist.

Abbildung 33 zeigt die Wirkung von 1 mM KCN auf die Ferrirubinanlagerung.

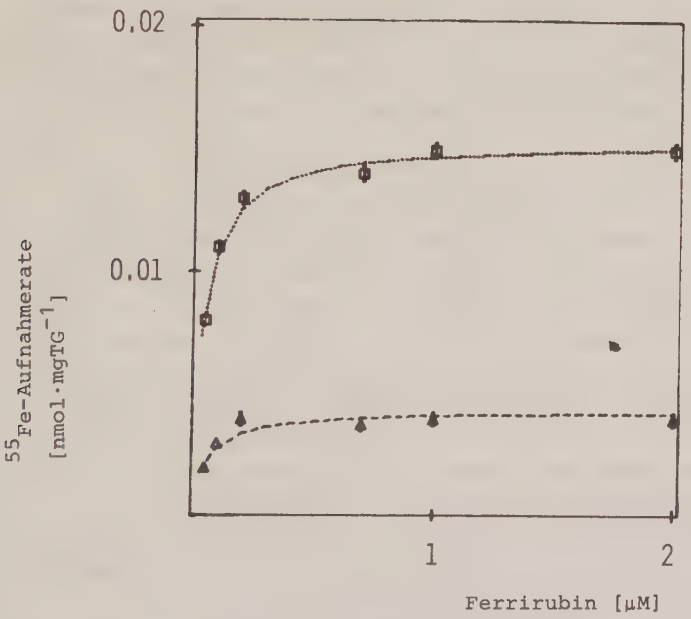


Abb. 33: Ferrirubinanlagerung
□ ohne, Δ mit 1 mM KCN

Abbildung 33 verdeutlicht, daß selbst der Anlagerungsvorgang von Ferrirubin an das Sideramintransportsystem auf eine energetisierte Membran angewiesen ist.

3.6. Mechanismus der Coprogenaufnahme

3.6.1. Zeitabhängige Aufnahme doppeltmarkierten Coprogens

Zu allen Versuchen mit doppeltmarkiertem Coprogen kam das nach 2.10.3. hergestellte Produkt zur Verwendung. Abbildung 34 zeigt den Verlauf der Aufnahme von ^{55}Fe und ^{14}C innerhalb von 10 Minuten. Die Stärke des Wiederaustritts der ^{14}C-Aktivität ist vom Zustand des Mycels abhängig. Unabhängig vom jeweiligen Sporenzustand jedoch ist die Beobachtung der unterschiedlichen Aufnahmegeschwindigkeit von Komplexbildner und Zentralion sowie die Beendigung des Aufnahmevorgangs bei 0.1 µM (bei einer Ausgangskonzentration von 0.2 µM). Die innere Konzentration der aufgenommenen Aktivität läßt sich nach der Beziehung mgTG der Mycelien zu Zellwasser (Volumen) nach Slayman (40) berechnen. Es wurde ein Anreicherungsfaktor von 1:400 festgestellt.

Abbildung 34 zeigt deutlich, daß die Coprogenaufnahme nicht nur aus einer einfachen Translokation des Komplexes besteht, sondern daß der Aufnahmevorgang selbst mit einer Trennung des Komplexes einhergeht. Schon die ersten Meßwerte (10, 20, 30 Sekunden) zeigen veränderte Verhältnisse zwischen den Radioaktivitäten auf. Die Aufnahme von ^{14}C-Aktivität verläuft schneller als die von ^{55}Fe. Ein gewisser Anteil des abgetrennten ^{55}Fe geht offensichtlich ins Medium verloren, da er nicht in der Aufnahmebilanz der abgesaugten Mycelien erscheint.

Bereits zwei bis drei Minuten nach der Inkubation wird der Austransport des Komplexbildners sichtbar, während die Menge an aufgenommenen Eisen intrazellulär konstant bleibt.

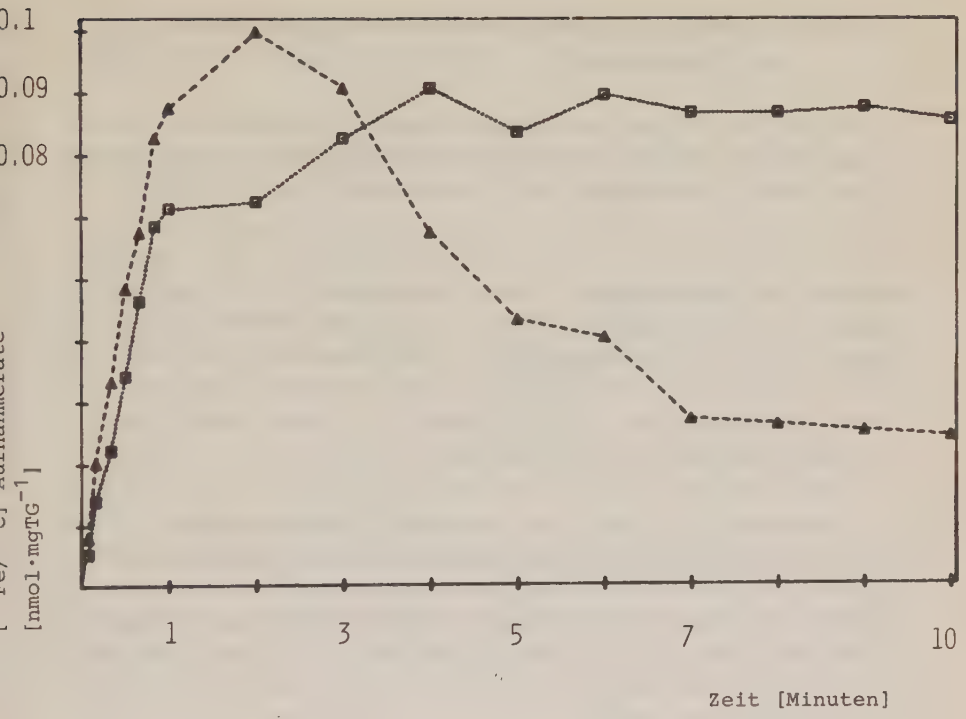


Abb. 34: Zeitabhängige Aufnahme von [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen
□ ^{55}Fe, △ ^{14}C

16 Stunden in Minimalmedium gewachsene Mycelien wurden auf Papierfilter abgesaugt und mit Minimalmedium gewaschen. 10 ml der in Minimalmedium resuspendierten Mycelien wurden im 25 ml Erlenmeyerkolben geschüttelt. Nach Zugabe der Radioaktivität wurde jede Minute ein Milliliter auf Membranfilter abgesaugt und im Scintillationszähler gemessen. In der gleichen Weise wurde auch bei allen weiteren Versuchen zur zeitabhängigen Aufnahme verfahren.

Werte aus zwei Ansätzen.

3.6.2. Aufnahmebilanz im Medium und in den Mycelien nach 10min. Inkubation

Folgender Versuch dient der quantitativen Bestimmung der Aufnahmevorgänge nach 10 Minuten Inkubation. Die Versuchsbedingungen sind mit denen von 3.6.1. identisch.

Nach der 10minütigen Inkubation in 0.2 µM (^{55}Fe, ^{14}C) doppeltmarkiertem Coprogen wurden Mycel und Medium auf ihre Radioaktivität geprüft. Das Medium wurde einrotiert; ein Teil davon wurde auf eine Dünnschichtplatte - der andere Teil auf eine XAD-Säule gegeben. Die H_2O- sowie die Aceton/Wasser-Fraktion wurde, nach Einengung, auf die Dünnschichtplatte gebracht sowie auf ihre Radioaktivität geprüft.

Die Gesamtradioaktivität der einzelnen Fraktionen wurden durch Hochrechnen auf die nach Einengung erhaltenen Volumina bestimmt. Da diese nicht exakt bestimmbar sind, können die erhaltenen Gesamtradioaktivitäten gewissen Schwankungen unterworfen sein. Als exakte Werte jedoch können die Quotienten (Q) der einzelnen Radioaktivitäten ($^{55}Fe/^{14}C$) aus den Einzelmessungen betrachtet werden.

Tab. 5: Aufnahmebilanz

	dpm ^{14}C	%	dpm ^{55}Fe	%	Q($^{55}Fe/^{14}C$)
Einsatz	122 300	100 %	2 420 000	100 %	20
Mycelien	21 350	17 %	1 850 000	73 %	40
Medium	80 000	65 %	160 000	6.6 %	1.3
XAD-H_2O	80	0.07 %	95 000	4 %	112
XAD-Ac.	75 000	62 %	94 000	3.5 %	1.3

Der Coprogentransport ins Zellinnere von Neurospora crassa verläuft für den Komplexbildner schneller als für das Zentralion (3.6.1.). Dies läßt den Schluß zu, daß neben der Menge freien

Eisens, welches in die Zelle gelangt, sich ein gewisser Anteil (^{14}C-Aufnahme minus ^{55}Fe-Aufnahme) im Medium aufhält.

Freies Eisen bleibt bei der Dünnschichtchromatographie am Start; auf der XAD-Säule wird es mit H_2O eluiert und kann im Scintillationszähler energiespektrographisch identifiziert werden (siehe Tab. 5).

Die gesamte ^{14}C-Aktivität des Mediums bleibt bei der H_2O-Elution auf der XAD-Säule. Wie der Quotient der Aktivitäten zeigt, ist jedoch nur jedes 15. Molekül ^{14}C mit einem ^{55}Fe-Ion versehen.

Die Menge an freiem Eisen im Medium wird durch die Menge an Komplexbildnern deutlich übertroffen (Tab. 5). Dennoch wird durch die XAD-Säule eine Trennung von ^{55}Fe- und ^{14}C-Aktivität erreicht. Deshalb kann angenommen werden, daß entweder das Zentralion oder der Ligand oder beide chemisch verändert vorliegen und bzw. oder das Zentralion an einen anderen Komplex gebunden ist.

Dünnschichtchromatographische Bestimmungen

Die dünnschichtchromatographischen Bestimmungen der Radioaktivitäten der einzelnen Fraktionen erfolgte jeweils mit und ohne vorheriger Zugabe von Fe^{3+}. Zur Lokalisierung und Identifizierung der Peaks wurde eine Dünnschichtchromatographie mit Coprogen und Desferricoprogen hergestellt. Zur Identifizierung des Desferricoprogens wurde die Dünnschichtplatte mit einer frisch angesetzten wäßrigen $FeCl_3$-Lösung besprüht. Es wurde festgestellt, daß bereits während des Laufs Metallionen aus der Kieselgelschicht durch Desferricoprogen komplexiert werden und vor der $FeCl_3$-Besprühung bereits gefärbt vorliegen. Der bei der $FeCl_3$-Besprühung sich am stärksten färbende Fleck ist mit ✪ gekennzeichnet.

Sonstige Bedingungen der Chromatographie siehe 2.8.

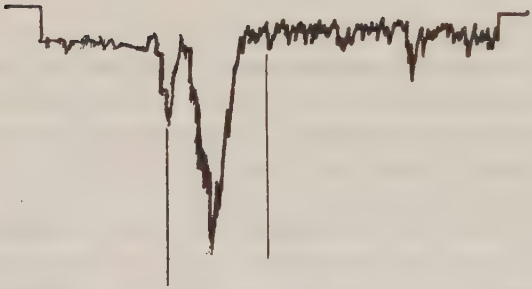
Start

Desferricoprogen

Coprogen

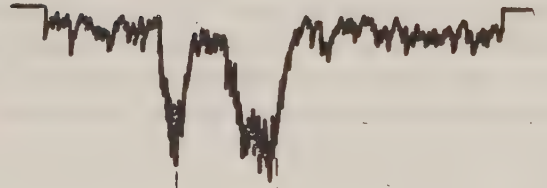
Vergleichsplatte

Abb. 35



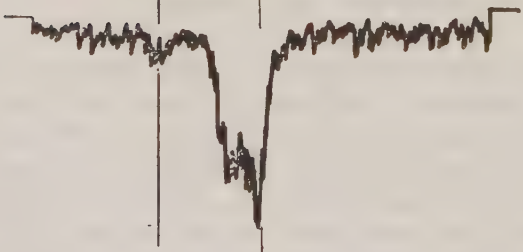
Medium

Abb. 36



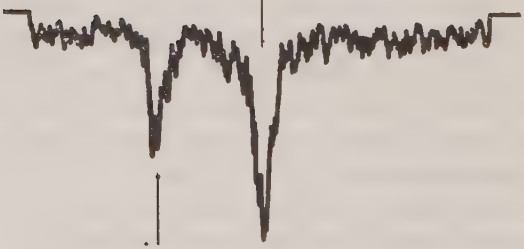
Medium + Fe^{3+}

Abb. 37



XAD-Ac.

Abb. 38



XAD-Ac + Fe^{3+}

Über den vier Scanner-Diagrammen ist die Vergleichsplatte angeordnet (Markierung und Herstellung siehe Seite 51).

In Abbildung 35 ist die Radioaktivität des einrotierten Mediums wiedergegeben. Sie läßt Parallelen zu Desferricoprogen auf der Vergleichsplatte erkennen. Die Aktivität am Start ist freies Eisen. (Chromatographische Auftrennung der XAD-H_2O-Fraktion (ohne Abbildung) und Abbildung 30 - 31 lassen diesen Schluß zu.)

In Abbildung 36 ist zu sehen, daß die Lage des 'Desferrisideramin-Peaks' durch Zugabe von Fe^{3+}-Ionen veränderbar ist. Gleichzeitig ist zu erkennen, daß ^{55}Fe freigesetzt wird.

Die XAD-Aceton/Wasser-Fraktion enthält die gesamte ^{14}C-Aktivität des Mediums (Tab. 5). Ihre Lage in der Dünnschicht ist in Abbildung 30 zu erkennen. Durch die vorhergehende H_2O-Elu-ierung wurde das freie Eisen entfernt, offensichtlich aber auch der Komplexbildner verändert. Durch Zugabe von $FeCl_3$ ^{55}Fe (Abb. 38) erhöht sich der Coprogenpeak deutlich, während ^{55}Fe freigesetzt wird.

Zusammenfassend kann man zwei Diskussionspunkte festhalten:

a) Nach drei Minuten Coprogenaufnahme wird ^{14}C-Aktivität bereits wieder ins Medium abgegeben (3.6.1.). Dünnschichtchromatographisch lassen sich zu Desferrisideramin Parallelen ziehen. Unklar jedoch ist, wieso nach Verbleib auf der XAD-Säule der R_f-Wert nicht mehr dem von Desferrisideramin entspricht (siehe dazu Abb. 37, XAD-Ac).
(Bei der Trennung des Moleküls entstandene Spaltprodukte von Desferricoprogen?)

b) Bei der Coprogenaufnahme entsteht freies Eisen, welches zum Teil ins Medium gelangt. Sollte das ^{55}Fe als dreiwertiges Ion vorliegen, so müßte aufgrund der Menge an Komplexbildner und dessen Bildungskonstante der Komplex Coprogen zu erwarten

sein. Da das im Medium befindliche ^{55}Fe jedoch nicht an der ^{14}C-Aktivität gekoppelt ist und sich die Scanner-Charakteristik durch Zugabe von $FeCl_3$ von Bild 35 zu Bild 36 verändert, liegt der Schluß nahe, daß es sich hierbei nicht mehr um ein $^{55}Fe^{3+}$-Ion handelt.

Sollte es sich um ein $^{55}Fe^{2+}$-Ion handeln, so muß es an eine vor Oxidation mit Sauerstoff schützende Komponente gebunden sein, da Aufarbeitung der Medien und die Dünnschicht nicht unter Sauerstoffabschluß durchgeführt wurden.

3.6.3. Nachweis von Fe^{2+} im Medium mit Ferrozine (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenyl-Sulfonic Acid) -1,2,4-Triazine)

Es wurde versucht, in den einzelnen Fraktionen des Mediums nach der 10minütigen Inkubation mit Ferrozine Fe^{2+} nachzuweisen. Nach dem Einengen der Fraktionen wurden zu 50 µl Medium 20 µl 1 mM Ferrozine zugesetzt.

Als Kontrolle bzw. als Nullwert wurden Mycelien verwendet, deren Coprogenaufnahme durch Ferrirubin bzw. durch KCN (siehe 3.6.4.) gehemmt war.

Coprogenkonzentration 0.2 µM.

Tab. 6: Nachweis von Fe^{2+} in verschiedenen Fraktionen des Inkubationsmediums vor und nach der Adsorption an XAD-2

Fraktion	ohne Hemmstoff	2 µM Ferrirubin	1 mM KCN
vor XAD	-	-	-
nach XAD H_2O-Eluat	⊠	-	-
nach XAD Aceton-H_2O-Eluat	-	-	-

- = keine Farbreaktion mit Ferrozine
⊠ = Farbreaktion mit Ferrozine

Obwohl der Fe^{2+}-Nachweis im H_2O-Eluat der XAD-Säule positiv verläuft, ist im unbehandelten, lediglich einrotiertem, Medium Fe^{2+} durch Ferrozine nicht nachweisbar. Die im Medium den Fe^{2+}-Nachweis durch Ferrozin störenden Anteile müssen demnach mit der ^{14}C-Aktivität auf der XAD-Säule bleiben.

3.6.4. Hemmung der Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen mit DNP und Ferrirubin

Ferrirubin blockiert die Anlagerungsstelle für Coprogen. DNP hingegen lagert sich in die biologischen Membranen und macht diese für Protonen durchlässig. Dies hat zur Folge, daß die arbeitende Atmungskette kein ATP mehr produziert.

Ohne ATP ist die Energetisierung der Zellmembran gestört.

Bei der Hemmung mit DNP wurde 5 Minuten mit 10 µM vorinkubiert. Die Hemmstoffkonzentration während der 10 Inkubationsminuten betrug 1.01 mM. Die Ferrirubinkonzentration betrug

2 µM, ohne Vorinkubation. Die Konzentration des doppeltmarkierten Coprogens: 0.2 µM. Das Inkubationsvolumen: 10 ml.

Abbildung 39 zeigt die ungehemmte Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen und im Vergleich der Größenordnung dazu die Aufnahme mit Ferrirubin.

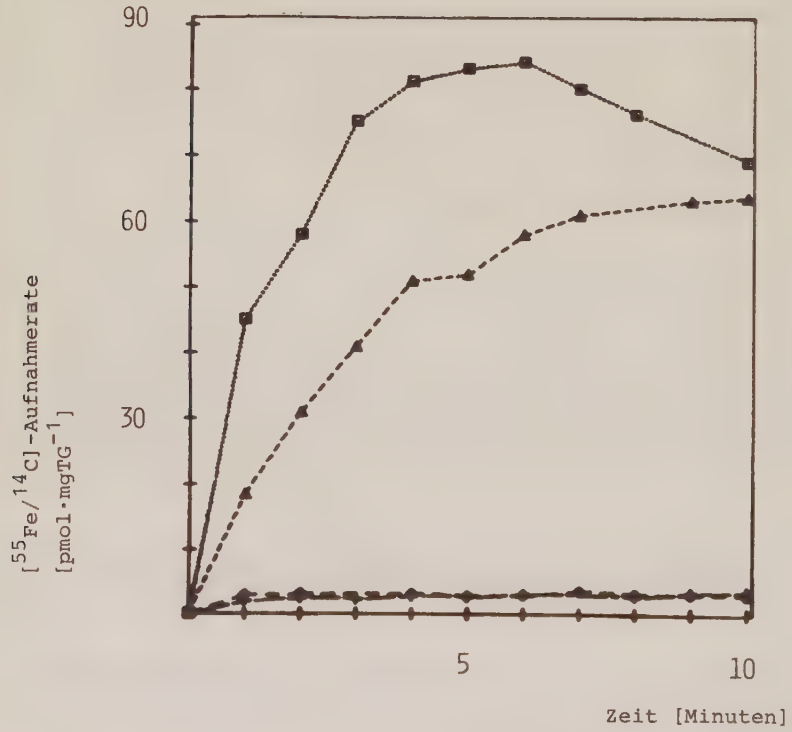


Abb. 39: Hemmung der Aufnahme von 200 pmol·ml^{-1} [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen
Ohne Hemmstoff: Δ ^{55}Fe, □ ^{14}C
Mit Ferrirubin (2 µM): ◇ ^{55}Fe, + ^{14}C

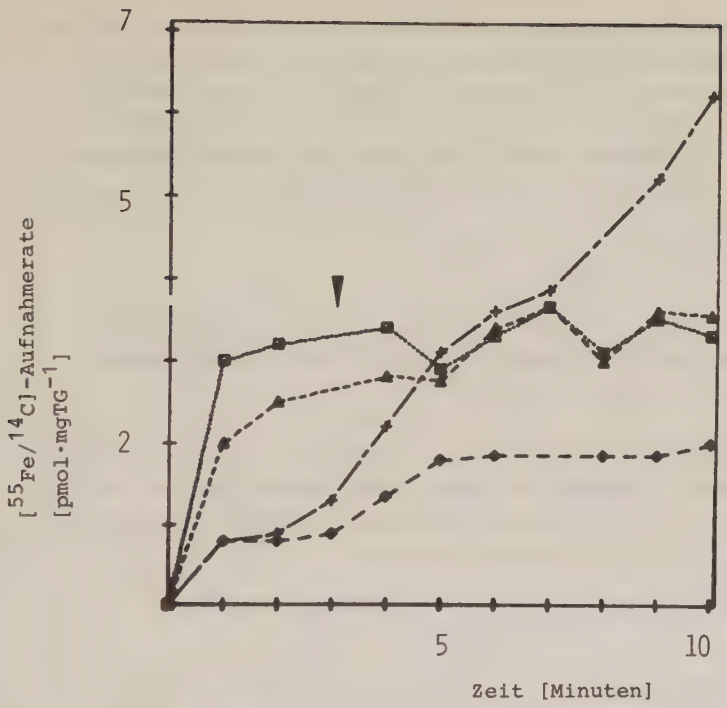


Abb. 40: Hemmung der Aufnahme von 200 pmol·ml^{-1} [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen
mit 1 mM DNP: □ ^{55}Fe, △ ^{14}C
mit 2 µM Ferrirubin: + ^{55}Fe, ◇ ^{14}C
(Ausschnitt aus Abb. 39)

Wie aus Abbildung 40 zu entnehmen ist, findet bei Anwesenheit von DNP, neben der Transporthemmung, auch keine Dekomplexierung mehr statt.

Die Inkubationskonzentration von 1 mM DNP scheint sich erst nach vier Minuten auszuwirken. Die Vorinkubation (10 µM DNP) zeigt, wie Abbildung 40 deutlich macht, schon ausreichende Wirkung.

Bei der Ferrirubinhemmung jedoch ist der Mechanismus, welcher für die Trennung des Moleküls verantwortlich ist, noch intakt. Wie in Abbildung 13 zu erkennen, findet bei einer Coprogentransporthemmung mit 2 µM Ferrirubin noch eine geringfügige Aufnahme von Substrat statt. Wie diese vorhandene Restaufnahme zeigt, findet noch eine Abtrennung des Eisens vom Liganden statt.

3.6.5. Hemmung der Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen durch Begasen mit N_2

Abbildung 41 zeigt die Wirkung der Begasung mit N_2 auf die zeitabhängige Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen. Es erfolgte keine Vorbegasung mit Stickstoff. Substratkonzentration 0.2 µM in 10 ml Inkubationsvolumen.

3.6.6. Effekt der KCN- bzw. der Ferrirubingabe nach drei Minuten Inkubation von 0.1 µM [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen auf die aufgenommene Menge an ^{55}Fe- und ^{14}C-Aktivität

Bei einer Coprogenkonzentration von 0.1 µM erreicht N.crassa nach ca. drei Minuten den maximalen Konzentrationsunterschied an intrazellulärem ^{55}Fe zu extrazellulärem ^{55}Fe (3.6.1.). Nach dreiminütiger Inkubation von 100 pmol·ml^{-1} doppeltmarkiertem Coprogen wurde 1 mM KCN oder 2 µM Ferrirubin zugesetzt.

Sowohl der ^{55}Fe-Kurvenverlauf als auch der für ^{14}C zeigen erst 2-3 Minuten nach der KCN-Gabe Abweichungen von den ungehemmten Transportraten: Die Menge an gebundenem ^{55}Fe geht von 20 auf 14 pmol·mgTG^{-1} zurück. Die ^{14}C-Wiederabgabe erscheint verlangsamt.

Bei Hemmung mit Ferrirubin (nach drei Minuten Inkubation) erscheint die ^{14}C-Wiederabgabe beschleunigt, während die Menge an gebundenem ^{55}Fe leicht zunimmt.

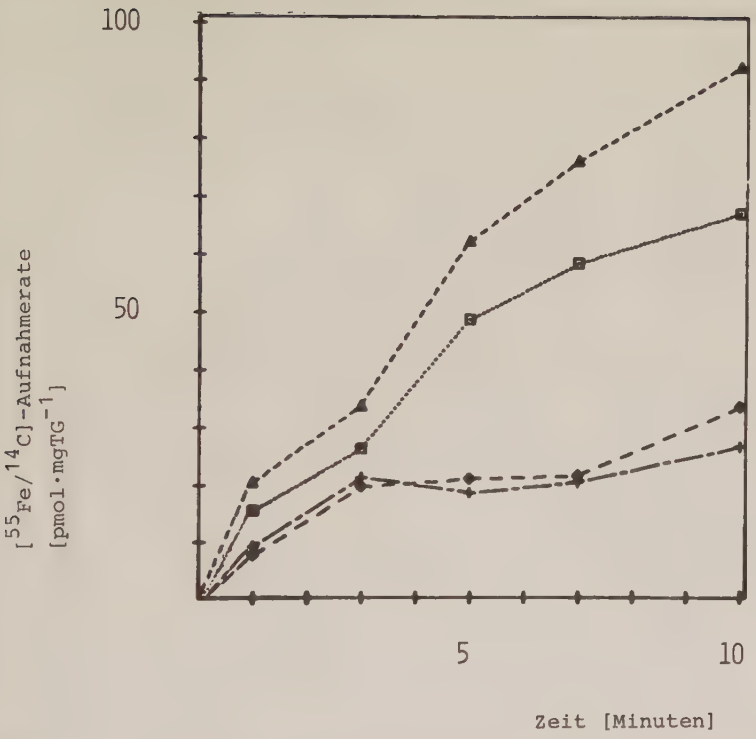


Abb. 41: Hemmung der Aufnahme von doppeltmarkiertem [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen mittels Begasen mit N_2

ohne N_2 □ ^{55}Fe △ ^{14}C

mit N_2 + ^{55}Fe ◇ ^{14}C

Abbildung 42 gibt die Wirkung von 1 mM KCN, Abbildung 43 die von 2 µM Ferrirubin wieder.

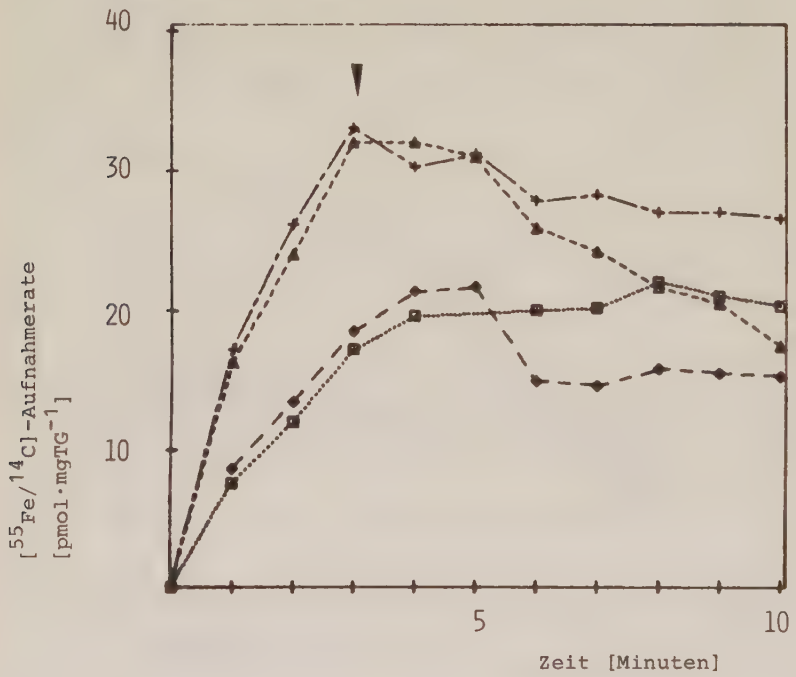


Abb. 42: Wirkung von 1 mM KCN auf die innere Konzentration an

□ ^{55}Fe Δ ^{14}C ohne KCN

◇ ^{55}Fe + ^{14}C 1 mM KCN

Nach drei Minuten Inkubation der Mycelien in 0.1 µM [$^{55}Fe/^{14}C$]-Coprogen wurde 1 mM KCN zugesetzt (Pfeil). Danach wurde wie beschrieben (Abb. 34, 2.11.) im Minutentakt die Radioaktivität der Mycelien bestimmt.

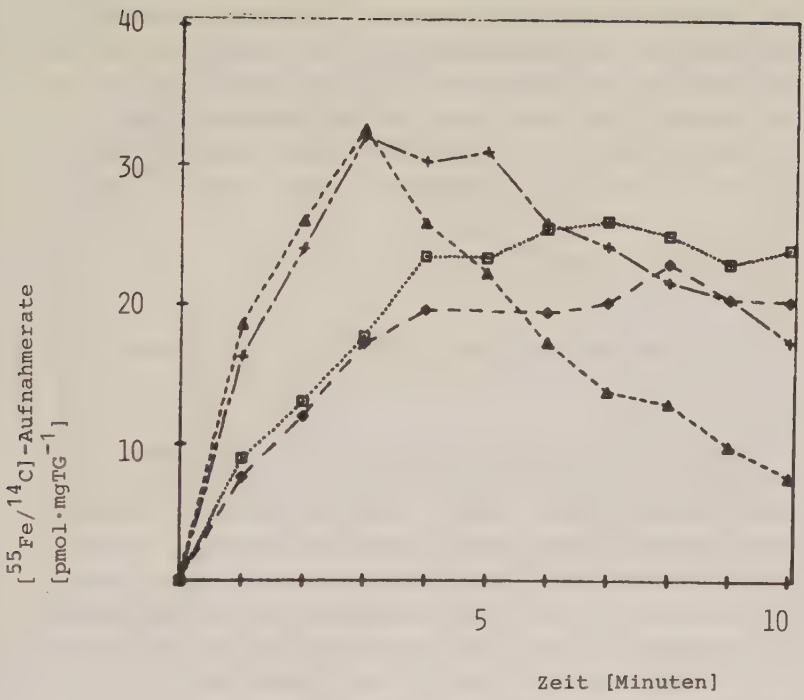


Abb. 43: Wirkung von 2 µM Ferrirubin auf die Aufnahme von 0.1 µM [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen

◇ ^{55}Fe + ^{14}C ohne Ferrirubin

□ ^{55}Fe Δ ^{14}C 2 µM Ferrirubin

Bedingungen wie in Abb. 42

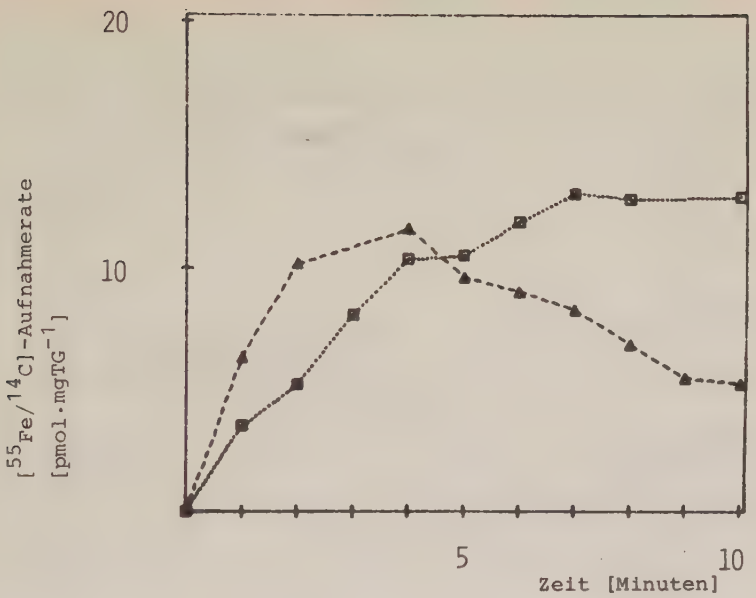
Die Wiederabgabe von ^{14}C ist bei gehemmter Atmungskette deutlich abgeschwächt. Da im Eisenmangelzustand Desferricoprogen bis zu einer Außenkonzentration von 0.5 mM ausgeschieden wird (34), kann man davon ausgehen, daß der Austransport von Desferricoprogen aktiv und gegen ein Konzentrationsgefälle verläuft. Dies korreliert mit der Beobachtung der Hemmung des Wiederaustransports von aufgenommener ^{14}C-Aktivität durch KCN.

Bei der Ferrirubinhemmung ist mangels ^{14}C-Zufluß, welche die Wiederabgabe von ^{14}C überlagert, die ^{14}C-Wiederabgabe deutlicher zu erkennen. Die Zunahme von ^{55}Fe muß durch eine gewisse Austauschbarkeit der Zentralionen in den Sideraminen erklärt werden. Ein Teil des an der Transportstelle sitzenden Ferrirubin erhält aus der doppeltmarkierten Substratmenge ^{55}Fe-Zentralionen.

3.6.7. Bestimmung des Anreicherungsfaktors der Coprogenaufnahme bei N.crassa

Die Bestimmung des Anreicherungsfaktors wurde mit doppeltmarkiertem Coprogen bei Konzentrationen von 0.05, 0.1 und 0.2 µM durchgeführt. Nach jeweils einer Minute Inkubationszeit wurde eine Aufnahmeratebestimmung durchgeführt. Dadurch konnte der Endpunkt der ^{55}Fe-Aufnahme bestimmt werden. Auch die zeitabhängige ^{14}C-Aufnahme- und Abgabecharakteristik konnte gut beobachtet werden. Die Konzentration in den Keimschläuchen wurde durch die Beziehung zwischen Zellwasser und mg Trockengewicht nach Slayman (40) bestimmt:

µl Zellwasser/mg Trockengewicht = 2.54



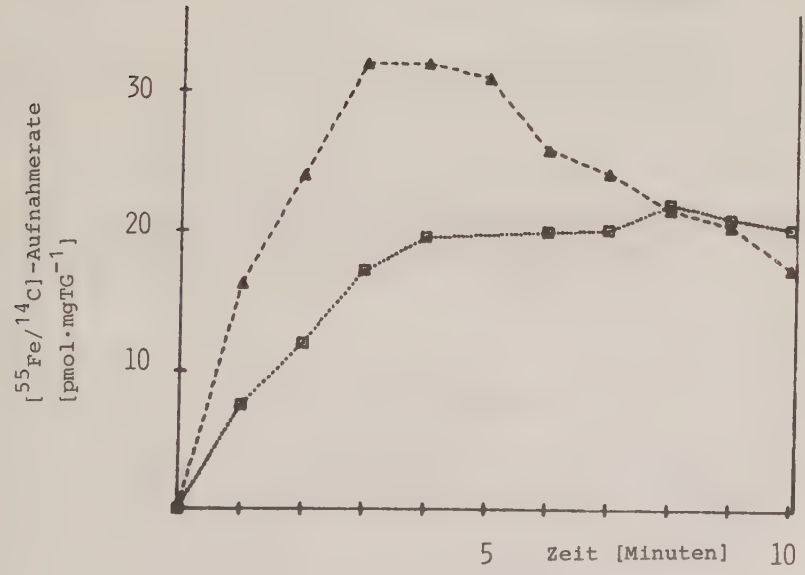


Abb. 44 (oben) und Abb. 45 (unten):
Zeitabhängige Aufnahme von [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen für Ausgangskonzentrationen 50 pmol·ml^{-1} (oben) und 100 pmol·mol^{-1} (unten)
□ ^{55}Fe, Δ ^{14}C

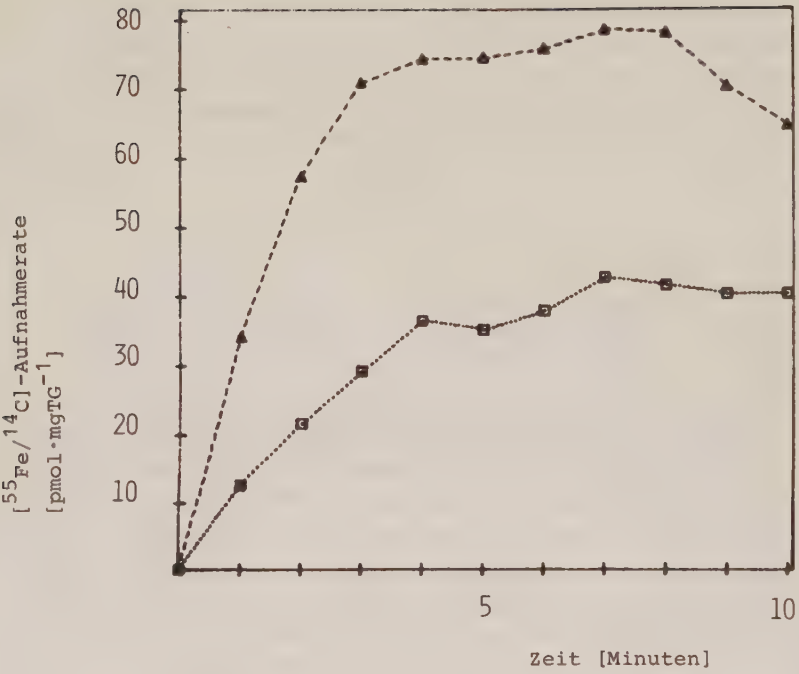


Abb. 46: Zeitabhängige Aufnahme von [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen mit einer Ausgangskonzentration von 200 pmol·ml^{-1}
□ ^{55}Fe Δ ^{14}C

Tab. 7: Anreicherungsfaktoren

Substratkonzentration	Anreicherungsfaktor für ^{55}Fe
0.05 µM	108
0.10 µM	95
0.20 µM	99

Bei dieser Sporenpräparation erreicht N.crassa, unabhängig von der Ausgangskonzentration des Substrats Coprogen, einen Konzentrationsunterschied von 1:100. Ein Transport von Coprogen nur nach den Gesetzen der Diffusion scheint damit auszuscheiden.

3.6.8. Zeitabhängige Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen im Nichteisenmangel

Für den Coprogentransport im Nichteisenmangel stellt sich die Frage, ob es sich dabei um eine Siderochromaufnahme handelt, die der im Eisenmangel entspricht und nur in der Affinität und Quantität reduziert ist oder ob im Nichteisenmangel ein Coprogentransport vorliegt, der im Mechanismus von dem im Eisenmangel unterschiedlich ist.

Abbildung 47 zeigt die zeitabhängige Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen in eisenversorgte 16-Stunden-Mycelien.

Es muß ein Coprogentransport vorliegen, der sich im Mechanismus von dem im Eisenmangel beobachteten unterscheidet, weil eisenversorgte Mycelien bei der Aufnahme von Coprogen keine Trennung in Ligand und Zentralion vornehmen.

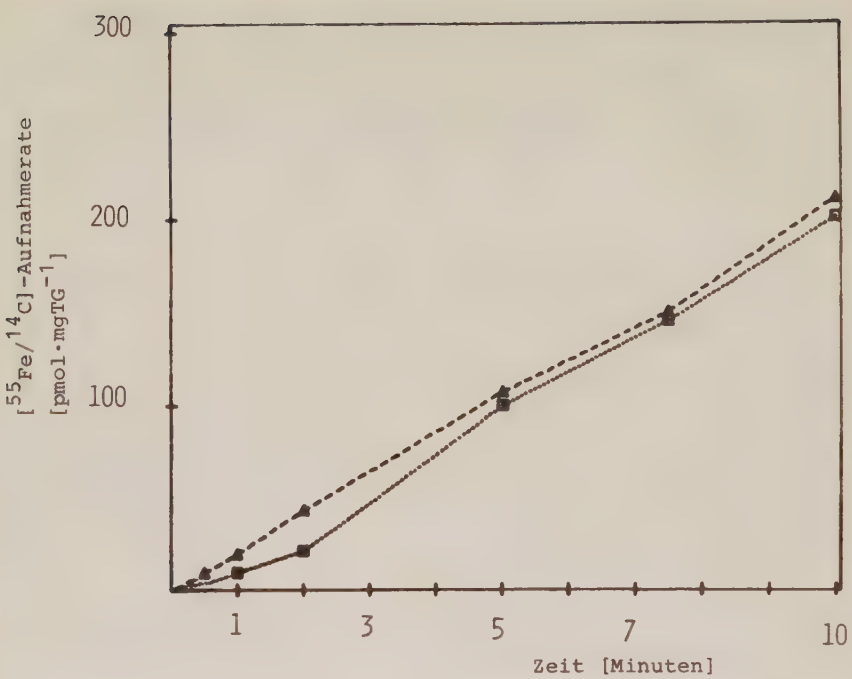


Abb. 47: Zeitabhängige Aufnahme von [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen im Nichteisenmangel
Coprogenkonzentration 10.2 µM
□ ^{55}Fe △ ^{14}C

3.7. Quantifizierende Untersuchungen der Transportstellen für Siderochrome

3.7.1. Bestimmung der Wechselzahl einer Transportstelle

Die Bestimmung der Wechselzahl einer Transportstelle für Coprogen wurde wie folgt vorgenommen:
Der Aufnahmevorgang von [^{55}Fe]-Ferrirubin konnte als Anlagerungsreaktion des Siderochroms an das Transportsystem für

Coprogen identifiziert werden (siehe 3.4.2., Abb. 29). Dadurch war es möglich, die Anzahl der Coprogentransportstellen zu bestimmen. Diese wurde definiert als Anzahl der angelagerten Ferrirubinmoleküle pro mg/Trockengewicht. Zur Bestimmung dieser Zahl wurden 4 Konzentrationswerte von Ferrirubin im Sättigungsbereich gewählt (0.05 - 2 µM).

Die Aufnahmegeschwindigkeit·mgTG^{-1} wurde durch Messungen im Minutenabstand, bis 5 Minuten, bei einer Coprogenkonzentration vorgenommen, die im Sättigungsbereich der Michaelis-Menten-Hyperbel liegt.

Als Kontrolle dazu der gleiche Meßvorgang mit einer Coprogenkonzentration, bei welcher die Aufnahmegeschwindigkeit bereits bekannt war (3.6.1., 3.6.7.).

Messung der maximalen Aufnahmerate bei 10.2 µM Coprogen, als Kontrolle bei 0.2 µM Coprogen.

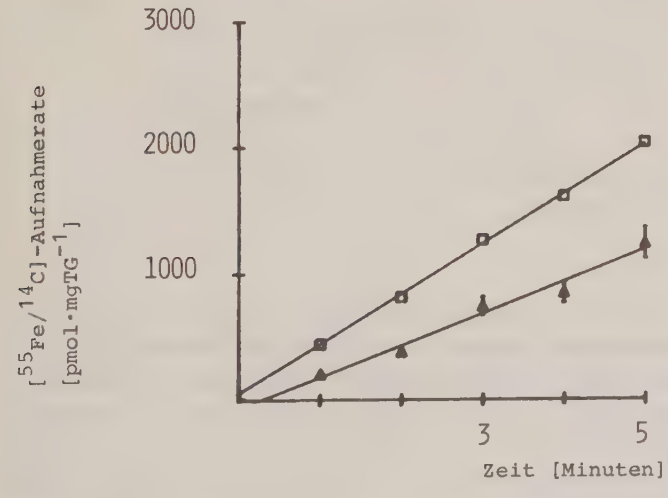


Abb. 48: Bestimmung der maximalen Aufnahmerate für ^{55}Fe und ^{14}C bei einer Coprogenkonzentration von 10.2 µM
Δ ^{55}Fe □ ^{14}C

Als Kontrolle dazu die Aufnahme-Geschwindigkeit bei einer Substratkonzentration von 0.2 µM.

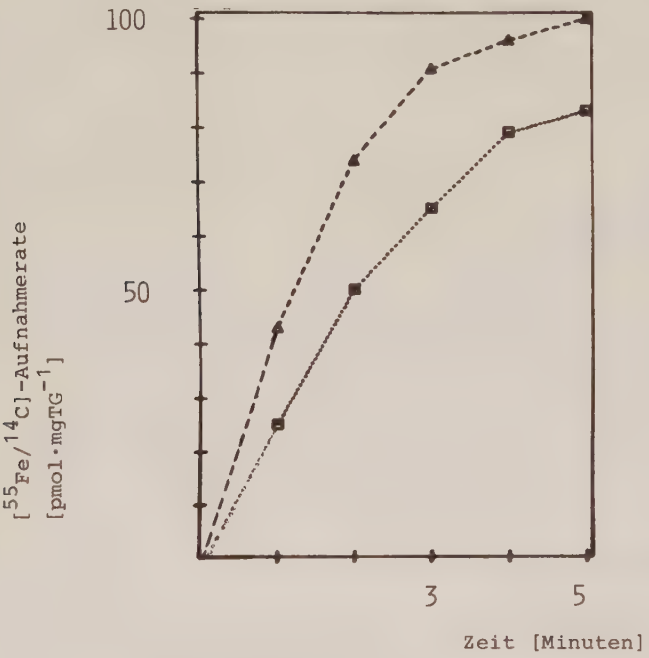


Abb. 49: Aufnahme von 0.2 µM Coprogen
□ ^{55}Fe Δ ^{14}C

Bei der Bestimmung der Aufnahmestellenanzahl mit Ferrirubin wurden im Sättigungsbereich der Hyperbel im V/[S]-Diagramm Messungen vorgenommen. Der Wert für V_{max} entspricht der Anzahl der Aufnahmestellen (siehe dazu Abbildung 50).

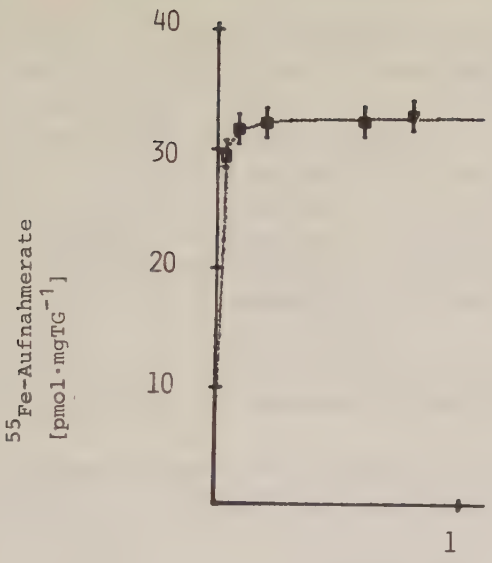


Abb. 50: Transportstellenbestimmung mit Ferrirubin im V/[S]-Diagramm

V_{max} bzw. Anzahl der Transportstellen:
33 pmol mgTG^{-1}

Auswertung der Graphik in Abb. 48:

^{55}Fe-Aufnahmerate = 250 pmol mgTG^{-1}min^{-1}
^{14}C -Aufnahmerate = 400 pmol mgTG^{-1}min^{-1}

Der Quotient aus der Aufnahmerate und der Transportstellenanzahl pro mgTG ergibt die Wechselzahl, welche sich nunmehr nur noch auf eine Transportstelle bezieht. Sie wird in sec^{-1} angegeben. Es ergeben sich für ^{55}Fe und ^{14}C folgende Werte: Wechselzahl für ^{55}Fe = 0.13 sec^{-1}, d.h. ein Aufnahmevorgang für ^{55}Fe dauert ca. 8 Sekunden. Die Wechselzahl für ^{14}C = 0.2 sec^{-1}, woraus sich die Zeit für einen Aufnahmevorgang für ^{14}C mit 5 Sekunden berechnen läßt.

3.7.2. Bestimmung der Transportstellenanzahl pro Spore und μ^2 Keimschlauchoberfläche

Um die Anzahl der Transportstellen pro ausgekeimter Spore zu bestimmen, wurden Keimschläuche (16 h) in Medium 10 Minuten mit Ferrirubin inkubiert. Ferrirubin zeigt eine minimale Eisenabgabe, wird aber mit hoher Affinität vom Coprogentransportsystem gebunden (3.4.1., 3.3.2., 3.4.2., 3.6.3., 3.7.1.). Die Transportstellenbestimmung mit Ferrirubin ergab:

Transportstellen: 31 $pmol \cdot mgTG^{-1}$
das entspricht: $1.81 \cdot 10^{13}$ Stellen

Die Bestimmung der ausgekeimten Sporen in der Neubauerzählkammer ergab:

Keimschläuche: $5.67 \cdot 10^{6}$ ml^{-1}

Die Beziehung zwischen ml und mgTG wurde nach 2.5. hergestellt.

1 ml Zellsuspension = 0.98 mg Trockengewicht

Die Transportstellenanzahl dividiert durch die Anzahl der ausgekeimten Sporen pro mgTG ergibt die Anzahl der Transportstellen für eine ausgekeimte Spore.

Transportstellen pro Keimschlauch: $3.1 \cdot 10^{6}$

Die Oberfläche der Keimschläuche wurde mikroskopisch bestimmt: Länge 30 - 50 µ, Durchmesser 4 - 5 µ.

Mittelwert der Keimschläuche: r = 2.3 µ, l = 40 µ
Fläche eines Keimschlauchs ($2 \pi rl$): 580 μ^2

Transportstellenanzahl pro μ^2 = 5400

Die Zahl der Aufnahmestellen pro μ^2 korreliert mit der bekannten Zahl der ATPase pro μ^2.
Anzahl der ATPase pro μ^2 5000 - 6000 (Felle, persönliche Mitteilung).

3.8. Temperaturabhängigkeit der Aufnahme von doppeltmarkiertem Coprogen

Die Aufnahme von [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen bei verschiedenen Temperaturen wurde wie unter 2.13. beschrieben durchgeführt.

Abbildung 51 zeigt die unterschiedliche Wirkung der Temperatur auf die Aufnahme von [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen bei einer Außenkonzentration von 5.1 µM Coprogen.

Die beiden Kurvenverläufe besitzen ein gemeinsames Optimum bei 30° (Celsius), sowie bei 0° ein gemeinsames Minimum. Letzteres liegt in demselben Größenbereich wie die mit Ferrirubin bestimmte Transportstellenanzahl. Das würde bedeuten, daß die Energetisierung der Membran in bezug auf die Anlagerung nicht durch Abkühlen auf 0° verloren geht, jedoch der Transport selbst, d.h. die Translokalisierung nicht mehr durchgeführt werden kann. Siehe dazu Abb. 51.

Zwischen Minimum und Optimum der Kurvenverläufe für ^{55}Fe und ^{14}C, vor allem aber überhalb des Optimums, zeigen die Werte für ^{55}Fe eine stärker ausgeprägte Sensibilität gegenüber Temperaturänderung als die entsprechenden ^{14}C-Werte.

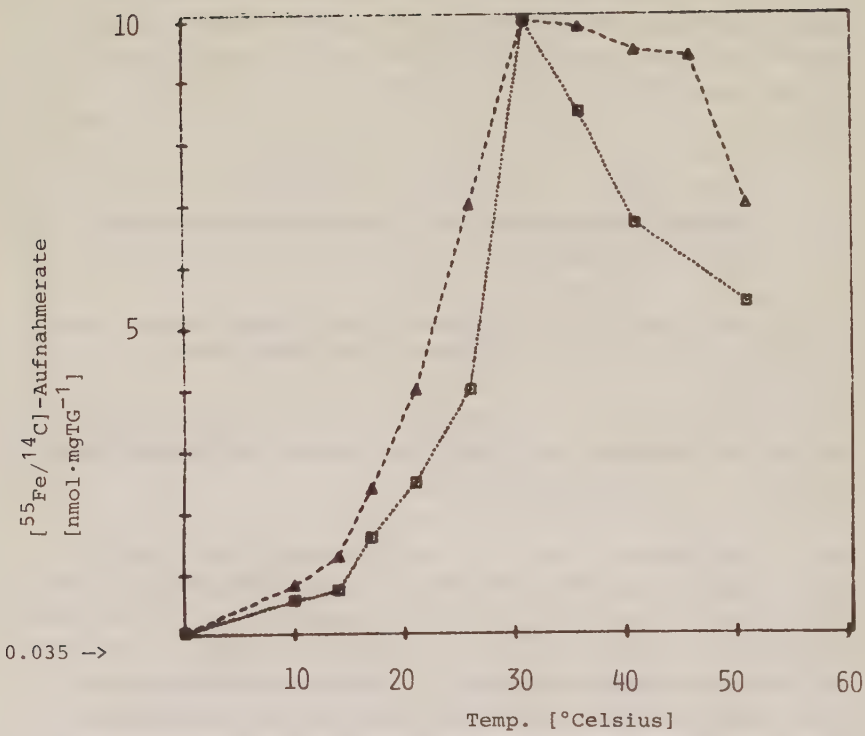


Abb. 51: Temperaturabhängigkeit der [^{55}Fe/^{14}C]-Coprogen-aufnahme

□ ^{55}Fe Δ ^{14}C

Bedingungen siehe 2.13.

3.9. Gleichgewichtsdialysen mit Plasmamembranextrakten, lipophilen Extrakten und ganzen Zellen von Neurospora crassa slime

Die Plasmamembranen wurden nach 2.14., die Plasmamembranextrakte nach 2.15. hergestellt.

Für die lipophilen Extrakte wurden abzentrifugierte Zellen von Neurospora crassa slime in 2-Chloräthanol suspendiert, über Nacht stehengelassen und dann von den unlöslichen Komponenten per Zentrifugation getrennt.

Für die Gleichgewichtsdialysen mit ganzen Zellen wurde ein 100 ml Erlenmeyerkolben (mit 16 h-Mycelien) in 5 ml Minimalmedium (+ Glukose) aufgeschwemmt.

Zur Gleichgewichtsdialyse siehe 2.16.

Tab. 8: Ergebnis der Gleichgewichtsdialyse nach 3 Stunden Äquilibrierung

	Proteinseite	Nichtproteinseite
angereicherte Zellen	859 dpm	845 dpm
lipophile Extrakte	840 dpm	843 dpm
lipophile Extrakte + 2 mM ATP, 20 mM $MgCl_2$ 1 mM NADH	890 dpm	881 dpm
Plasmamembranen	888 dpm	895 dpm
Plasmamembranen + 2 mM ATP, 20 mM $MgCl_2$ 1 mM NADH	864 dpm	855 dpm

4. DISKUSSION

Bei physiologischem pH-Wert, d.h. bei pH 7, liegt Eisen in wäßriger Lösung als $Fe(OH)_3$ vor. Unter diesen Bedingungen sind freie Eisenionen kaum nachweisbar. (Das Löslichkeitsprodukt von $Fe(OH)_3$ wurde mit 10^{-36} (19) bis 10^{-39} (3) bestimmt.

Durch die Fähigkeit des Eisens die Valenz zu wechseln, ist Eisen ein unentbehrlicher Bestandteil von Redoxvorgängen in lebenden Zellen. Zu den wichtigsten Funktionen zählen neben der Sauerstoffbindung des Häm-gebundenen Eisens, der Elektronentransport auf O_2 sowie bei einigen Mikroorganismen auf N_2, bzw. auf H_2. Auch in der Elektronentransportkette der Photosynthese autotropher Organismen nehmen Eisenionen eine bedeutende Rolle ein.

Bei neutralem pH und aeroben Bedingungen kommt es zur Ausbildung von Polymeren mit einem durchschnittlichem Molekulargewicht von $1.4 \cdot 10^5$ (41). Mikroorganismen machen sich deshalb unlösliches Eisen über Komplexbildner wie Siderochrome und organische Säuren für ihren Stoffwechsel zugänglich.

Desferrisiderochrome bilden mit dreiwertigen Ionen wie Al^{3+}, Ga^{3+}, insbesondere aber mit Fe^{3+} stabile, octahedrale Komplexe. Die Bildungskonstante für den Eisenkomplex beträgt 10^{30} (27). Damit sind die Desferrisiderochrome in der Lage, das in Polyaquokomplexen ausgefallene Eisen (III) zu komplexieren. Mit der Eisenbindung durch Desferrisiderochrome geht eine Konformationsänderung des Liganden einher, welche zu einer Lipoidisierung des Komplexes führt (29).

Bei allen bisher untersuchten Siderochromen sind die Hydroxamatgruppen in Λ-cis Konformation um das Fe^{3+}-Zentralion angeordnet (24). Hexapeptid-Siderochrome zeigen eine ellypsoide Molekülgestalt, bei der auf der einen Seite der Hydroxamat-Eisenkomplex angeordnet ist, während sich auf der anderen Seite die lipophilen Anteile des Liganden befinden (24).

Obgleich die Desferrisiderochromkomplexe mit Fe, Al und Ga eine hohe Bildungskonstante aufweisen, sind sie aufgrund ihrer schwachen Kristallfeld-Stabilisierungsenergie kinetisch instabil. Diese Komplexe zeigen Austauschreaktionen mit freien oder in anderen labilen Komplexen gebundenen Ionen. Die Austauschhalbwertszeit für Siderochrom-Eisenkomplexe und freiem Eisen liegen im Minutenbereich. Chrom- und Kobalt-Komplexe mit Desferrisiderochromen haben jedoch eine starke Kristallfeld-Stabilisierungsenergie und sind somit kinetisch inert. Sie zeigen, im Gegensatz zu den Fe-, Al- und Ga-Komplexen, keine Austauschreaktionen mit freien oder komplexierten Ionen.

Zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) hat eine um Größenordnungen geringere Affinität zu Desferrisiderochromen als die oxidierte Form. Die Bildungskonstante von Fe^{2+}-Desferrisiderochrom liegt bei 10^8, die von Fe^{3+}-Desferrisiderochrom im Vergleich dazu bei 10^{30} (27).

Durch seine hohe Austauschrate ist das Eisen-Zentralion eines Siderochromkomplexes einem Reduktionsmittel wie Natriumdithionit zugänglich und kann aufgrund der niedrigen Bildungskonstanten von Fe^{2+}-Desferrisiderochrom mit einem Fe^{2+}-spezifischen Liganden wie Ferrozine umkomplexiert werden (eigene Daten).

Die Löslichkeitseigenschaften der Siderochrome werden als amphiphil angegeben (28). Im Chloroform/H_2O-System kann Coprogen jedoch nur in der wäßrigen Phase nachgewiesen werden. Auch die reduzierten Produkte aus Coprogen, Desferricoprogen und Fe^{2+}, bzw. der Fe^{2+}-Desferricoprogenkomplex, sind in der Chloroformphase nicht nachzuweisen (eigene Daten).

Im Gegensatz dazu ist es Emery gelungen, in wäßriger Phase gelöstes Ferrichrom durch eine Benzylalkohol/Chloroformphase zu transferieren und in einer zweiten wäßrigen Phase, reduziert, mit Ferrozine nachzuweisen (9).

Die mikrobielle Desferrisiderochromsynthese wird durch Anzucht in eisenhaltigem Medium unterdrückt (28). Eine einmal angelaufene Siderochromsynthese läßt sich nicht so schnell wieder unterdrücken. Sie ist abhängig von der eingesetzten Metallkonzentration und beträgt etwa 24 Stunden (44). Dieser Regulationsmechanismus verläuft für eine Regulation auf Enzymebene zu langsam. Eine Reprimierung der Desferrisiderochromsynthese über eine Genblockierung liegt nahe.

Zum Mechanismus der siderochromvermittelten Eisenaufnahme werden von Leong und Neilands drei mögliche Transportarten vorgeschlagen:

1. Der Siderochrom-Eisenkomplex gibt an der Außenseite der Cytoplasmamembran sein Zentralion an einen in der Membran befindlichen Fe-Komplexbildner ab. Dabei gelangt der Siderochromligand nur bis an die Außenseite der Cytoplasmamembran, nicht aber ins Zellinnere. Der in der Membran gelöste sekundäre Eisenkomplex wird (unter Reduktion) durch ein Cytoplasmaenzym getrennt und das Eisen dem Zellinneren zugänglich gemacht (23).

2. Der Siderochrom-Eisenkomplex durchschreitet die Cytoplasmabarriere als Gesamt-Komplex. Hierbei wird die Trennung des Moleküls erst im Cytoplasma vorgenommen. Der Ligand wird sodann entweder enzymatisch zerlegt oder zur weiteren Fe-Komplexierung ins Medium abgegeben (23).

3. Der Sideramin-Eisenkomplex wird von der Cytoplasmamembran unter synchroner Trennung in Zentralion und Ligand ans Cytoplasma abgegeben. Um Wiederkomplexierung des Eisen(III)-Ions mit dem Desferrisiderochrom zu vermeiden, ist entweder eine Reduktion des Eisens oder eine Kompartimentierung der Bestandteile des getrennten, ins Cytoplasma abgegebenen Komplexes zu fordern (eigene Angaben) (23)..

Parallel zu den von Leong und Neilands diskutierten Möglichkeiten des Siderochromeisen-Aufnahmemechanismus wird von verschiedenen Autoren die Frage gestellt, ob die Siderochrom-Eisenaufnahme an ein bestimmtes Transportsystem gebunden ist. Alle drei Aufnahmemechanismen sind theoretisch auch ohne spezielles Transportsystem denkbar.

Eine größere Anzahl natürlich vorkommender Ionophoren erreichen in ihrer enantiomeren Form eine 100prozentige Aufnahme durch die Mitochondrienmembran (30). Auch die geringe Spezifität der Siderochromaufnahme bei bestimmten Bakterien deutet nicht auf die Interaktion eines speziellen Membrantransportsystems hin (32,35).

Unterschiedliche Aufnahmeraten und Kinetiken wurden im Gegensatz dazu bei Neurospora crassa gefunden, wenn man zwei enantiomere Formen eines Siderochroms anbietet (45). Parallel zu dieser Beobachtung kann bei Neurospora crassa eine ausgeprägte Siderochromspezifität beobachtet werden. Diese Beobachtungen sprechen zweifellos gegen einen Transport durch die Cytoplasmamembran ohne Interaktion mit einem speziellen Transportsystem.

Unter diesen Aspekten sollen folgende Diskussionspunkte erörtert werden:

1. Sättigungsverhalten der Coprogenaufnahme
2. Hemmungskinetik der Coprogenaufnahme
3. Interaktion Ferrirubin - Siderochromtransportsystem
4. Der Weg des Liganden
5. Der Weg des Zentralions
6. Energetik des Coprogentransports
7. Mechanismus des Coprogentransports

1. Sättigungsverhalten der Coprogenaufnahme

a) Eisenmangel

Die Aufnahmeraten von ^{55}Coprogen im V/[S]-Diagramm entsprechen einer rechtwinkligen Hyperbel. Die mittlere Abweichung der Meßpunkte von der berechneten, optimalen Hyperbel liegen innerhalb der experimentell ermittelten Fehlergrenze.

Der K_M-Wert der Coprogenaufnahme liegt bei 5 µM. Die maximale Aufnahmerate, bezogen auf mg Trockengewicht, beträgt ungefähr 1 nmol/min. Der letzte Wert ist erheblichen Schwankungen unterworfen, da unausgekeimte Sporen zwar in das Trockengewicht mit eingehen, nicht aber zur ^{55}Coprogenaufnahme beitragen. Die Auskeimungsrate hat auf die Michaeliskonstante keinen Einfluß. Sie ist maßgeblich vom Alter der Sporenpräparation abhängig. Siehe dazu die Abbildungen 1 - 4.

Im Gegensatz zur Diffusion wird bei einem Transport mit Hilfe eines bestimmten Transportsystems ein bestimmter Teilschritt bzw. eine Konzentration eines Reaktionsteilnehmers zum reaktionsgeschwindigkeitslimitierenden Faktor. Bei einer enzymatischen Reaktion ist die Menge an Enzym, genauer gesagt, die Menge an dem eigentlich reagierenden Enzym-Substratkomplex für die Gesamtreaktion limitierend beim Transportsystem wird hingegen bei steigender Substratkonzentration die Menge an sogenanntem 'Carrier' für die Gesamtaufnahmereaktion limitierend.

Dies ist der Fall bei der ^{55}Coprogenaufnahme von Neurspora crassa im Eisenmangel.

b) Nichteisenmangel

Die Aufnahmeraten von ^{55}Coprogen im V/[S]-Diagramm entsprechen bei eisenversorgtem Mycel nicht einer rechtwinkligen Hyperbel. Die mittlere Abweichung der Punkte von der errechneten, optimalen Hyperbel liegen außerhalb der experimentell ermittelten Fehlergrenze.

Eine Angabe von K_m und V_{max} für die [^{55}Fe]-Coprogen-Aufnahme im Eisenmangel ist deshalb nicht möglich.

Die ermittelten Aufnahmeraten lassen sich vielmehr mit einer Geraden in Einklang bringen. Die Abweichungen der Meßpunkte von der optimalen Geraden liegen innerhalb der experimentellen Fehlergrenze (Abbildungen 5 - 7).

Da die Aufnahmeraten quantitativ wesentlich unterhalb von denen im Eisenmangel ermittelten liegen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um eine unspezifische Anlagerung an das Mycel bzw. an den Membranfilter handelt.

Im Nichteisenmangel liegt auf jeden Fall, im Gegensatz zum Eisenmangel, bei der Aufnahme von [^{55}Fe]-Coprogen kein limitierendes Moment vor. Die Aufnahmeraten im Nichteisenmangel entsprechen aus diesem Grunde einer Diffusionsgeraden.

c) Allgemein

Die Coprogenmoleküle sind im Gegensatz zu den von Ovchinnikov (30) diskutierten "klassischen" Ionophoren in der Cytoplasmamembran nicht frei beweglich. Eine Erhöhung der Außenkonzentration an Coprogen im Eisenmangel von 10 auf 100 µM ergibt keine meßbare Erhphung der Anzahl aufgenommener Coprogenmoleküle.

Anzucht der Sporen mit 10^{-5} M Fe^{3+}, bzw. 10^{-5} M Coprogen, bedingt nicht nur eine quantitative Reduzierung der Aufnahmeraten, es tritt auch eine Änderung der Aufnahmekinetik ein: Der Sättigungskinetik im Eisenmangel steht die Diffusionsgerade im Nichteisenmangel gegenüber.

Dieses Phänomen ist mit freier Beweglichkeit des Siderochroms in der Cytoplasmamembran oder mit einer Regulierung der Membranviskosität nicht zu erklären. Vielmehr deutet alles darauf hin, daß im Eisenmangel ein Akzeptor für Siderochrome in

der Cytoplasmamembran vorhanden ist, welcher im eisenversorgten Mycel fehlt, oder in seiner Transportierfähigkeit blokkiert ist.

2. Hemmungskinetik

In der Enzymkinetik sind als die zwei wichtigsten Hemmarten die kompetitive und die nichtkompetitive Hemmung bekannt.

Bei der nichtkompetitiven Hemmung wird durch den Hemmstoff eine bestimmte Menge an Enzym aus dem Reaktionsgeschehen genommen. Dies ist durch die Konzentration an Substrat nicht beeinflußbar. Entweder ist der Angriffsort des Hemmstoffs an Enzym nicht mit dem aktiven Zentrum, dem Bindungsort des Substrats, identisch oder die Bindung des Hemmstoffs mit dem aktiven Zentrum ist irreversibel (man kann hier auch zwischen un- und nichtkompetitiver Hemmung unterscheiden).

Bei der kompetitiven Hemmung bindet der Hemmstoff an dem aktiven Zentrum des Enzyms reversibel. Durch die Konzentration an Substrat ist der Hemmeffekt beeinflußbar. Beide Moleküle, das Substrat sowie der Hemmstoff, 'konkurrieren' um das aktive Zentrum des Enzyms. Bei unterschiedlichen K_M-Werten müssen die Maximalgeschwindigkeiten der enzymatischen Reaktion identisch sein.

Schon bei einer Konzentration von 2 µM vermag Ferrirubin die Coprogenaufnahme von Neurospora crassa effektiv zu hemmen (Abb. 10). Wie jedoch aus Abbildung 11 und 12 zu entnehmen ist, liegt bei 'unendlicher' Substratkonzentration die identische Maximalgeschwindigkeit der Aufnahme an Coprogen vor, d.h. im Lineweaver-Burk Diagramm besitzen die Schnittpunkte der Geraden auf der Y-Achse (1/ S = O) denselben Wert.

Die beiden Siderochrome Ferrirubin und Coprogen konkurrieren um eine identische Stelle, die den Transport ins Zellinnere

bewirkt, wobei, wie man beim Vergleich des K_i-Wertes, vor allem des nachgereinigten Ferrirubins (K_i = 0.06 µM) mit dem K_M-Wert des Coprogentransports (K_M = 5 µM) feststellen muß, der Hemmstoff Ferrirubin um zwei Zehnerpotenzen affiner zu dem aktiven Zentrum der Transportstelle ist.

Würden Siderochrome durch freie Beweglichkeit in der Cytoplasmamembran in die Zelle gelangen, dürften sich zwei verschiedene Siderochrome gegenseitig wohl kaum, vor allem aber nicht in dem Ausmaß wie bei Ferrirubin und Coprogen beobachtet, an der Passage der Cytoplasmamembran hindern.

Die Hemmungscharakteristik der Coprogenaufnahme in Gegenwart von Coprogen-Dextran (MG ~ 70.000) zeigt ebenfalls kompetitive Merkmale (Abb. 17 und 18). Da bei einer kompetitiven Hemmung die Hemmkonstante K_i sowie der K_M-Wert des Enzyms die Affinität von Hemmstoff bzw. von Substrat zum aktiven Zentrum des Enzyms (oder der Transportstelle) beschreiben, ist zu erwarten, daß die Hemmkonstante der Coprogen-Dextran-Hemmung in der gleichen Größenordnung wie die Michaeliskonstante der ^{55}Coprogenaufnahme selbst liegt (K_i = 4 µM, K_M = 5 µm). Dies kann als zusätzlicher Hinweis gewertet werden, daß die Hemmung der Coprogenaufnahme durch Coprogen-Dextran und die Coprogenaufnahme selbst an einer identischen, definierten Stelle an der Cytoplasmamembran stattfindet.

Die nach Gesetzen der Diffusion funktionierende 'Restaufnahme' im Nichteisenmangel ist durch Ferrirubin nicht hemmbar (Abb. 26). Diese 'Restaufnahme' korreliert mit derjenigen, die bei einer Hemmung der Coprogenaufnahme durch 20 µM Ferrirubin zu beobachten ist. Beide Vorgänge entsprechen nicht mehr den Gesetzen der Sättigungskinetik (siehe Abbildung 11/12 und Abbildung 26). Ob es sich hierbei in beiden Fällen um eine zweite, nicht Ferrirubin-sensible und nach den Gesetzen der Diffusion arbeitende Transportstelle handelt oder ob eine unspezifische Anlagerung an Versuchsobjekt und Filter vorliegt, wurde nicht näher untersucht.

3. Interaktion Ferrirubin - Siderochromtransportsystem

Bereits bei der Hemmung des Coprogentransports durch Ferrirubin wurde deutlich, daß Ferrirubin eine große Affinität zum Transportsystem der Siderochrome in Neurospora crassa besitzt (K_i-Wert der Coprogenhemmung: ~ 0.05 µM).

Dieser Wert konnte bei Aufnahmeversuchen mit ^{55}Ferrirubin wiedergefunden werden. In Abbildung 28 schneiden beide Geraden des Lineweaver-Burk Diagramms die 1/ S-Achse bei $2 \cdot 10^7$, was einem K_M-Wert von 0.05 µM entspricht.

Die maximale Ferrirubinaufnahmerate entspricht jedoch nur derjenigen von Coprogen im Nichteisenmangel und erreicht nur weniger als ein Zehntel der Coprogenaufnahmerate im Eisenmangel (vgl. Abbildung 8). Die Vermutung, daß es sich hierbei nicht um einen Transport, sondern nur um eine Anlagerung des Ferrirubins an das Siderochromtransportsystem handelt, konnte durch eine zeitabhängige ^{55}Ferrirubinaufnahmestudie erhärtet werden (Abbildung 29).

Es handelt sich deshalb nicht um den K_M-Wert einer Transportreaktion, sondern, wie die Ähnlichkeit mit K_i der Coprogentransporthemmung schon andeutet, um K_S, der Substratkonstanten von Ferrirubin gegenüber dem Siderochromtransportsystem.

Der K_S-Wert von 0.05 µM, bzw. die Bildungskonstante von $2.0 \cdot 10^7$ entspricht einer freien Bindungsenergie von -42 $kJ \cdot M^{-1}$. Dieser Wert liegt in der Größenordnung bekannter Interaktionen zwischen Proteasen und ihren Effektoren, die wegen ihrer entsprechenden Molekulargrößen als Vergleiche herangezogen wurden. Die Bindungsenergie zwischen Trypsin und einem Effektor bzw. Inhibitor beträgt -20.9 $kJ \cdot M^{-1}$ (11).

Die Beobachtung, daß Ferrirubin, obgleich affin zum Transportsystem, nicht transportiert, sondern nur angelagert wird, gibt auch der maximalen Transportgeschwindigkeit der Ferrirubinaufnahme eine andere Bedeutung. Sie gibt die Anzahl der

Transportstellen wieder und sollte nicht, wie bei Coprogenaufnahmeversuchen, durch die Inkubationszeit dividiert werden (Abbildung 29). Voraussetzung dazu ist die Annahme, daß eine Transportstelle nur jeweils ein Molekül Ferrirubin bindet.

Die Anzahl der mit Ferrirubin bestimmten Transportstellen beträgt pro Keimschlauch ~ $3 \cdot 10^6$ und pro μ^2 ~ 5000.

4. Der Weg des Liganden

Über das Schicksal des eisenkomplexierenden Liganden während des Transportvorgangs wurden verschiedenartige Beobachtungen veröffentlicht.

Bei Bacillus subtilis wird nur eine Akkumulierung des Eisens, nicht aber des Komplexbildners beobachtet. Der Komplexbildner soll an der Außenseite der Membran abgetrennt werden, während das Zentralion unter Energieverbrauch in die Zelle transportiert wird (32).

Bei Ustilago sphaerogena wird erst nach einer halben Stunde Inkubation mit Ferrichrom ein Austransport des Liganden festgestellt. Hier wird der Transport des gesamten Komplexes in die Zelle postuliert, wobei erst im Cytoplasma die Trennung des Moleküls erfolgen soll; danach schließt sich die Ausscheidung des Desferriferrichroms ins Medium, zur erneuten Komplexierung eines Eisen(III)-Ions an (9).

Die Mycobacterien produzieren zwei verschiedene Arten eisenkomplexierender Moleküle: die Exocheline, die sich im Medium aufhalten, und die Mycobactine. Letztere sind aufgrund einer langen Alkyl-Seitenkette lipophil und membrangebunden. Bei der exochelinvermittelten Eisenaufnahme soll an der Außenseite des Cytoplasmas eine Umkomplexierung des Eisens in das membrangebundene Mycobactin erfolgen, wobei der Ligand des

Exochelins im Medium verbleibt. Eine reduktive Trennung von Mycobactin in Desferrimycobactin und Fe^{2+} unter Mitwirkung einer Oxidoreduktase und NADPH wurde beobachtet (48).

Ähnlich wie der Ferrichromtransport bei Ustilago sphaerogena zeigt die Schizokinenaufnahme von Bacillus megaterium zuerst synchrone Aufnahme von Zentralion und Ligand. Es wird diskutiert, daß erst nach Erreichen einer gewissen Konzentration an intrazellulärem Schizokinen eine Dekomplexierung des Komplexes mit anschließender Ausscheidung des Liganden stattfindet.

Über das Verbleiben des Liganden während des Coprogentransports bei N.crassa ist die BEobachtung gemacht worden, daß nach 10minütiger Inkubation von [$^{55}Fe/^{14}C$]-Coprogen eine gewisse Menge an ^{14}C-Aktivität in den Mycelien fehlt, welche wohl nach außen diffundiert sein müsse (13).

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte festgestellt werden, daß bei Neurospora crassa nach mehreren Minuten Inkubation mit [$^{55}Fe/^{14}C$]-Coprogen ein Austransport von ^{14}C-Aktivität zu beobachten ist (Abbildung 34).

Danach muß also nach spätestens zwei Minuten der [$^{55}Fe/^{14}C$]-Aufnahme ins Zellinnere (Abbildung 34) von den Mycelien ein Vorgang eingeleitet werden, der zur Trennung des aufgenommenen Coprogenmoleküls in einen verbleibenden ^{55}Fe-Anteil und in einen zur Ausscheidung bestimmten ^{14}C-Anteil führt.

Da Eisenkomplexbildner in größerer intrazellulärer Konzentration wegen ihrer Affinität zu Eisen für dessen Metabolismus, vor allem aber auch für die Atmungskette, Hemmstoffe darstellen, muß die Zelle die vom zentralen Eisen(III)-Ion getrennten Liganden entweder chemisch verändern oder ins Medium abgeben. Letzterer Mechanismus ist in jeder Zelle von N.crassa, welche unter Eisenmangelbedingungen angezogen wird, konstitutiv (43,44,45,46).

Die Beobachtung, daß überhaupt ^{14}C-Anteile des doppeltmarkierten Coprogens wiederausgeschieden werden, läßt vermuten, daß es sich hierbei um zur weiteren Eisenkomplexierung weiterverwendbare Moleküle, also hauptsächlich Desferricoprogen, handelt.

Durch dünnschichtchromatographische Analyse des Mediums nach 10minütiger Inkubation mit doppeltmarkiertem Coprogen konnte tatsächlich die bis zu 65 % wieder abgegebene ^{14}C-Aktivität als Desferricoprogen identifiziert werden (Abbildung 35 und 36). Die Fähigkeit, mit zugegebenem Fe^{3+} zu reagieren, wurde ebenfalls nachgewiesen (Abbildungen 35/36 und 37/38).

Neurospora crassa (Wild-Typ) vermag im Eisenmangel die Konzentration an Desferricoprogen im Medium bis zu 0.2 mM zu steigern (44). Da die intrazelluläre Konzentration an Desferricoprogen aus oben erwähnten Gründen nicht groß sein darf, sollte ein aktiver, energiebedürftiger Prozeß für die Ausscheidung von Desferricoprogen angenommen werden. Tatsächlich konnte eine verlangsamte ^{14}C-Wiedergabe beobachtet werden, wenn man nach vollendeter Aufnahme (nach 3 Minuten bei 0.2 µM Coprogen) 1 mM KCN ins Medium gibt. Bei dieser Hemmung der Wiedergabe von ^{14}C-Aktivität konnte eine 2 - 3minütige Einwirkdauer der KCN-Wirkung festgestellt werden (Abbildung 42, vgl. dazu Abbildung 31).

5. Der Weg des Fe(III)-Zentralions

Nach spätestens zwei Minuten Inkubation mit Coprogen tritt Trennung in Zentralion und Ligandenmolekül ein, zu erkennen an dem Wiederaustritt des abgetrennten Liganden ins Medium. Um Hinweise auf den Ort der Komplextrennung zu erhalten, stellt sich die Frage nach dem Verbleib des dekomplexierten oder unkomplexierten Eisens in der mikrobiellen Zelle. Nach den von Neilands (23) diskutierten drei möglichen Aufnahmemechanismen für Siderochrome kommen hierfür die Cytoplasmamembran oder das Cytoplasma in Frage.

Bei Mycobakterien wird als Eisenkomplex-Aufnahme eine Umkomplexierung an der Außenseite der Cytoplasmamembran diskutiert, bei der der Ligand im Medium verbleibt und das Eisen-Zentralion zunächst in der Membran komplexiert gebunden vorliegt (35).

Bacillus megaterium nimmt den Schizokinen-Komplex als Gesamtkomplex ins Cytoplasma auf, wo nach Erreichen einer bestimmten intrazellulären Schizokinenkonzentration die Spaltung des Moleküls und der Austransport des Liganden stattfinden soll. Bei dieser siderochrom-vermittelten Aufnahme sollte man das de- bzw. umkomplexierte Eisen im Cytoplasma vermuten (1).

Bei den angegebenen Versuchsbedingungen weist Neurospora crassa für den Transport von ^{55}Fe- und ^{14}C-Aktivität von doppeltmarkiertem Coprogen unterschiedliche Transportraten auf (Abbildungen 34,39,41,44-46,48-50,51) (45). Die Transportraten für ^{14}C liegen teilweise erheblich über denen für ^{55}Fe. Dieser Unterschied in den Transportarten ist nur in den ersten Minuten nach Inkubation mit doppeltmarkiertem Coprogen zu beobachten, da nach 2 - 3 Minuten der ^{14}C-Aufnahme die Wiederabgabe überlagert ist. Vom Liganden getrenntes Eisen muß demnach nicht nur in die Zelle, sondern auch teilweise ins Medium gelangt sein. Dies konnte chromatographisch (Abbildung 35 bzw. 35/36 und 37/38), vor allem aber im Scintillationszähler (Tabelle 5, Q-Wert der XAD-H_2O Fraktion) und mit Ferrozine (Tabelle 6) nachgewiesen werden.

Wie in allen Abbildungen ersichtlich, die die Aufnahme doppeltmarkierten Coprogens beinhalten, treten die unterschiedlichen Transportraten, bzw. die mit dem Q-Wert ($^{55}Fe/^{14}C$) des doppeltmarkierten Ausgangsprodukts nicht mehr übereinstimmenden dpm-Werte, bereits in den ersten Messungen (Abbildung 34: 10 Sekunden) auf.

Diese Beobachtungen können nur dahingehend diskutiert werden, daß die Trennung des Moleküls mit dem Aufnahmevorgang

zumindest zeitlich eng gekoppelt ist und in der Cytoplasmamembran stattfindet, so daß aus nicht näher untersuchten Gründen bei den angegebenen Versuchsbedingungen ein Teil des vom Liganden separierten Eisens statt in die Zelle auch ins Medium gelangt.

Würden die beiden, in der Cytoplasmamembran getrennten, Coprogenkomponenten, wie durch Neilands Modell Nr. 3 (23) beschrieben, synchron aus der Membran ins Cytoplasma abgegeben, so wäre die 'verlustreichere' ^{55}Fe-Aufnahme allein nicht zu erklären. Nur verschiedene Wege, für Ligand und Eisen, nach der Anlagerung des Siderochroms an das Transportsystem, können unterschiedliche Transportraten aufweisen.

Es bietet sich die Möglichkeit des Verbleibs von Eisen in der Cytoplasmamembran an, während der Komplexbildner ins Cytoplasma abgegeben wird. Diese Kompartimentierung des Eisens von seinem Komplexbildner wäre hinsichtlich der hohen Bildungskonstanten des Coprogen-Komplexes sinnvoll.

6. Energetik des Coprogentransports

Hinweise zur Energieabhängigkeit der siderochromvermittelten Eisenaufnahme bei Mikroorganismen sind vielfältig. So wurde eine äußerste Wirksamkeit der Inhibitoren des Energiestoffwechsels auf die Aufnahme von Rhodotoric acid von Rhodotorula pilimanae beobachtet (5). Ebenfalls sehr effektiv in bezug auf die Aufnahme von Ferrichrom bei Ustilago sphaerogena zeigten sich die Hemmer der Atmungskette und der oxydativen Phosphorylierung (9).

Auch bei Neurospora crassa wurde eine drastische Abnahme der Aufnahmerate von Coprogen in Gegenwart von Hemmstoffen des mikrobiellen Energiestoffwechsels beobachtet (12,13). Im Gegensatz dazu wird die Eisenaufnahme über Citrat wenig beeinflußt (45).

Keimende Sporen von Neurospora haben einen großen Sauerstoffbedarf (Abbildung 31), der bei Zugabe von 1 mM KCN nach drei Minuten Inkubation zum Erliegen kommt. Parallel dazu kann ein völliges Erliegen des Coprogentransports beobachtet werden, welches auch durch erhöhte Coprogenaußenkonzentrationen nicht beeinflußt wird (Abbildungen 32,39).

Es ist bekannt, daß bei Zugabe von CN^--Ionen der intrazelluläre ATP-Spiegel innerhalb von drei bis fünf Minuten auf unter 10 % sinkt (39). Eine Beteiligung von ATP an der Coprogenaufnahme liegt nahe. Da Begasen der Mycelien mit N_2 ähnliche Auswirkung auf den Coprogentransport zeigt und man davon ausgehen kann, daß der chemisch inerte Stickstoff, außer der Verdrängung von gelöstem Sauerstoff keine chemischen Reaktionen eingeht, erscheint ein direkter Angriff von CN^- auf die Transportstelle unwahrscheinlich.

Die Bindung von Ferrirubin an die Transportstelle ist in Gegenwart von KCN gestört (Abbildung 33). Es überrascht, daß selbst die Bindung eines Siderochroms an die Transportstelle einer energetisierten Membran bedarf. Wird die Cytoplasmamembran desenergetisiert, tritt ein gewisser Verlust von schon aufgenommenem, bzw. gebundenem Eisen ins Medium auf (Abbildung 42). Man könnte hier zwischen an die Membran gebundenen und ins Zellinnere transportiertem Eisen unterscheiden und den Anteil des nach KCN-Einwirkung beobachteten Fe-Verlustes dem Membran-gebundenen Anteil zurechnen.

Wird, wie unter 3.9. beschrieben, mit einer konzentrierten Lösung keimender Sporen eine Gleichgewichtsdialyse durchgeführt, so kann, unter Berücksichtigung des großen Sauerstoffbedarfs der Keimschläuche (Abbildung 31), davon ausgegangen werden, daß, bevor die Radioaktivität zugegeben werden konnte, in den Dialysezellen anaerobe Verhältnisse bestehen. Somit sind auch die Zellmembranen der Keimschläuche nicht mehr energetisiert. Es kann bei diesen Bedingungen keine Bindung von [^{55}Fe]-Coprogen (und natürlich auch kein Transport von [^{55}Fe]-Coprogen) an die Cytoplasmamembran von Neurospora crassa gemessen werden.

Isoliert man aus Zellen von N.crassa, welche vor der Präparation mit [^{55}Fe]-Coprogen inkubiert wurden, Cytoplasmamembranen, so sind diese Membranen in der Lage, die Aktivität zu einem gewissen, der Affinität der Siderochrome zum Transportsystem in vivo entsprechendem Teil, in der Proteinzelle zu halten (13). Zellmembranen nicht vorinkubierter Zellen von N.crassa sind nicht in der Lage, eine Gleichgewichtseinstellung der zugegebenen Radioaktivität zu verhindern (Tabelle 8).

Der erste Teilschritt des Coprogentransports in die Mycelien von N.crassa, die Bindung des Siderochroms an das Transportsystem, scheint ohne Energetisierung der Cytoplasmamembranen nicht funktionsfähig zu sein.

Bei der Ferrirubinhemmung ist der Transport von Coprogen ins Zellinnere stark gehemmt (Abbildung 13). Wie die Restaufnahme jedoch zeigt, ist der Mechanismus, welcher zur Molekültrennung führt, nicht gestört (Abbildung 40). Im Gegensatz dazu führt Hemmung mit der Entkopplersubstanz DNP neben der Transporthemmung auch zu einer völligen Einstellung der Trennung des Coprogenmoleküls (Abbildung 39,40). Der Angriffsort der Hemmer des mikrobiellen Energiestoffwechsels ist mit dem des Ferrirubins nicht identisch.

Die Trennung des Coprogenmoleküls in Eisen und Desferricoprogen ist ohne Energetisierung der Membran gestört.

Die Aufnahmeraten von Coprogen sind von der Außenkonzentration abhängig und deshalb von unterschiedlicher Größe. Die Aufnahme von Coprogen endet jedoch stets bei Erreichung eines bestimmten Konzentrationsunterschieds, der Werte erreicht, die über 1:100 liegen (Abbildung 44-46). Dies ist aus Gründen der Entropie ohne Energieaufwand nicht möglich.

Die drei Phänomene des Coprogentransports von N.crassa: Bindung, Trennung und Translokalisierung, zeigen Energieabhängigkeit. Daraus muß nicht der Schluß gezogen werden, daß ener-

gieliefernden Reaktionen an den drei Teilreaktionen getrennt angreifen, da die drei Teilreaktionen zeitlich und räumlich zumindest eng gekoppelt zu sein scheinen, ist ein zentraler Koppelungspunkt mit der energieliefernden Reaktion durchaus denkbar.

Das Membranpotential von N.crassa wird durch den intrazellulären ATP-Spiegel und den K^+- bzw. H^+-Gehalt des Außenmediums bestimmt (38,39). Da über einen weiten Konzentrationsbereich weder K^+ noch H^+ (40,42) die Coprogenaufnahme beeinflussen, scheint das Membranpotential weder direkt noch indirekt die aktive Aufnahme zu bewirken. Die ATP-Wirkung muß daher auf eine direkte Modifizierung des Transportsystems in der Cytoplasmamembran zurückgeführt werden. In diesem Zusammenhang ist die unter 3.7.2. ermittelte Transportstellenanzahl pro μ^2 interessant, die in derselben Größenordnung liegt wie die membrangebundene ATP-ase (5000 - 6000 Transportstellen bzw. ATP-ase-Stellen pro μ^2, Felle, persönliche Mitteilung).

Von diesen Beobachtungen ausgehend ist eine lineare Temperaturabhängigkeit der Coprogenaufnahme, wie sie bei einer energieunabhängigen Aufnahme, die den Gesetzen der Diffusion folgt, nicht zu erwarten. Tatsächlich zeigt die Aufnahme von Coprogen ein Temperaturoptimum bei 32° C, welches der Aufnahme von Fe mit Citrat fehlt. Bei diesem Temperaturoptimum sind die Aufnahmeraten für ^{55}Fe sowie für ^{14}C identisch. Sowohl unterhalb wie auch oberhalb des Optimums zeigt die ^{55}Fe-Aufnahme eine deutlich stärkere Sensibilität gegenüber Temperaturänderung als die Aufnahme von ^{14}C. Ab 45° C zeigen die Mitochondrien von N.crassa einen Abfall der Atmungstätigkeit (13). Dies dürfte wohl der Grund für den rapiden Abfall der ^{14}C-Aufnahmerate bei dieser Temperatur sein, während für den ^{55}Fe-Transport bereits ab 31° C weniger optimale Bedingungen vorliegen.

Neben den Aufnahmeraten von ^{55}Fe und ^{14}C beim Temperaturoptimum von 31° C liegen nur noch bei 0° C gleich große Aufnahmeraten für die Liganden und die Zentralionen vor. Sie

entsprechen quantitativ der mit Ferrirubin bestimmten Transportstellenzahl. Die Energetisierung der Cytoplasmamembran von N.crassa scheint durch Abkühlen auf 0° C in bezug auf die Coprogenbindung des Transportsystems nicht zusammenzubrechen. Der Schluß liegt hier nahe, daß die energetische Modifizierung des Transportsystems zeitlich gesehen vor der Bindung des Siderochroms stattfindet.

7. Mechanismus der Coprogenaufnahme

Wie die Interaktion des Coprogentransportsystems mit Ferrirubin zeigt, sind die Vorgänge an der Cytoplasmaaußenseite mit denen an der Innenseite nicht zu vergleichen. Große Affinität des Eisenkomplexes hinsichtlich des Siderochrom-Transportsystems ist nicht die alleinige Bedingung für einen optimalen Transport durch die Cytoplasmamembran von N.crassa.

Zentrale Fragestellung des Mechanismus der Coprogenaufnahme ist deshalb: Inwiefern ist die Ablösung des Coprogens von der Innenseite der Cytoplasmamembran mit dessen Trennung in Ligand und Zentralion gekoppelt, und wie wird diese von dem Organismus bewerkstelligt?

800 µg Cobalt und 1 µg Eisen im Medium erzielen einen Eisenmangelzustand in Mycelien von N.crassa, der ohne Cobalt bei der vorgegebenen Eisenkonzentration im Medium nicht zu beobachten ist (31). Cobalt hat zwar eine wesentlich niedrigere Bildungskonstante mit Desferricoprogen als Eisen, bildet aber kinetisch inerte Komplexe und ist im Gegensatz zu den Fe-Desferrisiderochromkomplexen schwerer verdrängbar (26). Cobalt ist wohl deshalb bei einem Verhältnis zu Eisen von 800:1 in der Lage, die Eisen-komplexierenden Liganden zum Teil zu besetzen. Die Hemmung des Fe-Desferricoprogentransports mit Co-Desferricoprogen, die den beobachteten Fe-Mangelzustand der Mycelien bedingt, ist jedoch nur erklärbar, wenn Co-Desferricoprogen an das Transportsystem bindet, aber nicht mehr

abgelöst werden kann. Der Ablösevorgang des Siderochroms scheint hiernach an die Herauslösung des Zentralions gekoppelt zu sein und dem Neilandschen Transportvorgang Nr. 3 (23) zu entsprechen. Da dies eben bei Co-Desferricoprogen nicht möglich ist und ein Austauschen von Cobalt durch Eisen am Transportsystem wegen des kinetisch inerten Charakters des Co-Desferricoprogens erschwert ist, scheint das Coprogentransportsystem dadurch irreversibel besetzt zu werden.

Von allen metallsubstituierten Coprogenkomplexen weisen die chemisch inerten Chrom- und Cobalt-Desferricoprogenkomplexe die niedrigsten Aufnahmeraten bei N.crassa auf (44). Erklärungsmöglichkeit siehe oben.

Rhodotorula pilimanae zeigt ebenfalls keine Aufnahme seines chromsubstituierten Siderochromkomplexes; seine Nichtdekomplexierbarkeit wird als Grund hierfür diskutiert (5).

Innerhalb der Enterobakterien werden für die kinetisch inerten, metallsubstituierten Siderochromkomplexe verschiedene Beobachtungen gemacht (27). Während bei E.coli die durch Kristallisation in Δ-cis Konformation überführte Chrom-Derivate des Coprogens gleich große Aufnahmeraten wie die physiologischen Fe-Komplexe aufweisen, hemmt Chrom-Desferriferrichrom die Aufnahme von Ferrichrom bei S.typhimurium (23). Diese verschiedenen Auswirkungen kinetisch inerter Metallsubstituenten des Coprogens auf die Coprogenaufnahme bei verschiedenen Organismen müssen wohl verschiedenen Mechanismen zugeordnet werden.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, daß der Coprogentransport zeitlich zumindest eng mit der Trennung des Moleküls gekoppelt ist (Abbildung 27 u.a.). Es liegen auch Hinweise vor, daß räumliche Korrelationen zwischen der Molekültrennung und dem Molekültransport besteht (Tabelle 5,6); beide scheinen in der Plasmamembran lokalisiert. Fügt man nun die Beobachtung hinzu, daß nicht trennbare, kinetisch inerte, metall-

substituierte Coprogenkomplexe den Coprogentransport hemmen, bzw. selbst nicht transportiert werden, so könnte geschlossen werden, daß der Transport von Coprogen bei N.crassa an die Trennung des Moleküls gekoppelt ist.

Fe-Mycobactin erhält sein Fe-Zentralion von den ins Medium ausgeschiedenen Exochelinen durch Umkomplexieren (48). Mycobacterium smegmatis macht dem Cytoplasma das im membranlöslichen Mycobactin komplexiert vorliegende Eisen(III)-Ion durch eine Siderochrom-Oxido-Reduktase zugänglich.

Auch in N.crassa konnte eine Sideramin-Oxidoreduktase nachgewiesen werden. Da mit Extrakten von Neurospora crassa Eisenmangelmycelien kein enzymatischer Abbau von Coprogen und Desferricoprogen beobachtet werden konnte, scheint diese Art der Dekomplexierung für die bei diesem Organismus beobachtete Molekültrennung (13) zu entfallen.

In dieser Arbeit deuten mehrere Beobachtungen darauf hin, daß in der Cytoplasmamembran von N.crassa bei der Aufnahme von Coprogen unter den angegebenen Bedingungen eine Reduktion des Fe(III)-Zentralions vorgenommen wird.

Erste Hinweise auf eine Reduktion des Eisens während des Transports von Coprogen in die Keimschläuche erhält man durch die Aufarbeitung des Mediums nach 10minütiger Inkubation mit doppeltmarkiertem Coprogen (Tabelle 5): Trotz der relativ großen Menge an wiederabgegebener, als Desferricoprogen identifizierter ^{14}C-Aktivität, wird mit H_2O mehr als die Hälfte des ^{55}Fe von der XAD-Säule eluiert, während beinahe die gesamte Menge an ^{14}C-Aktivität auf der Säule bleibt. Dies kann, liegt die ^{14}C-Aktivität wirklich als unverändertes Desferricoprogen vor, nur mit einer Reduktion des Fe(III)-Zentralions erklärt werden, die mit einer drastischen Herabsetzung der Komplexstabilität gegenüber Desferricoprogen von 10^{30} zu 10^{8} einhergeht (24). Auch zeigt die chromatographische Trennung des Inkubationsmediums eine fehlende Interaktivität zwischen der

Komponenten mit dem R_f-Wert von Desferricoprogen und dem radioaktiv im Medium nachgewiesenen Eisen (Abbildung 35). Daß dies mit der Desferricoprogen-R_f-Wert-Komponenten möglich ist, zeigt die Zugabe zusätzlichen dreiwertigen Eisens ($FeCl_3$) (Abbildung 36). Ist der Eintransport des Coprogens in das Zellinnere von N.crassa mit der Trennung des Moleküls verbunden, so muß für die Beobachtung des konstanten Anreicherungsfaktors für Coprogen im Eisenmangel (Abbildung 44-46) eine andere Erklärung gefunden werden als die des Konzentrationsgefälles innerhalb zu außerhalb der Zelle. Wird beim Eintransport von Coprogen in die Zellen von N.crassa Coprogen in Desferricoprogen und Fe^{2+} getrennt, so ist die intrazelluläre Coprogenkonzentration immer gleich null.

Ist für den Coprogentransport die Trennung des Moleküls, z.B. mittels Reduktion des Zentralions zu Fe^{2+} nötig, so kann die Beobachtung des bei einem ^{55}Fe-Konzentrationsunterschieds von 1:100 stagnierenden Transports nicht durch ein Coprogenkonzentrationsgefälle an der Cytoplasmamembran erklärt werden (eintransportiertes Coprogen liegt dann als Fe^{2+} und Desferricoprogen vor).
Als Erklärung hierfür kann die Beobachtung herangezogen werden, daß die Siderochrom-Oxido-Reduktase nur bis zu einer bestimmten Fe^{2+}-Produktkonzentration katalytisch tätig sein kann (13).

Die Inkubation mit doppeltmarkiertem Coprogen, das Einrotieren des abgetrennten Mediums sowie die anschließende Dünnschichtchromatographie wurden nicht unter N_2-Begasung durchgeführt, so daß spätestens während der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Mediums der größte Teil des reduzierten Eisens durch den Luftsauerstoff als Fe^{3+}, bzw. als Coprogen vorliegen müßte (eigene Daten). Da dies, wie Abbildung 35 zeigt, nicht der Fall ist, muß angenommen werden, daß das entstandene Fe^{2+} an ein vor Oxydation schützendes Agens gebunden sein muß.

Nach 10minütiger Inkubation von N.crassa mit 0.2 µM unmarkiertem Coprogen ist im Medium bei den angegebenen Bedingungen

Fe^{2+} als Ferrozinkomplex nachweisbar. Bei Hemmung mit Ferrirubin oder KCN verläuft dieser Nachweis unter gleichen Bedingungen negativ (Tabelle 6). Im Medium direkt ist der Nachweis des Fe^{2+}-Ions als Ferrozinkomplex jedoch nicht möglich, dies gelingt nur, nachdem über eine XAD-Säule lipophile Komponenten abgetrennt wurden.

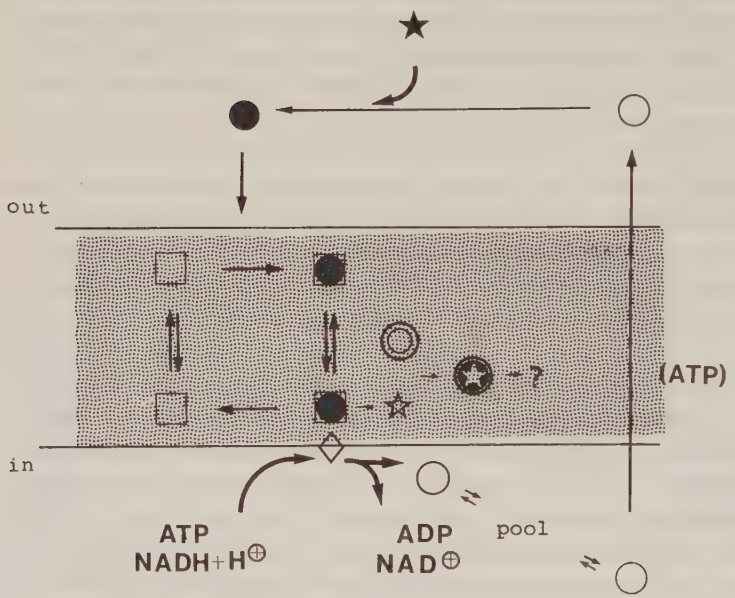
Es scheint demnach für das während des Coprogentransports entstehende Fe^{2+}-Ion eine vor Oxydation und vor der Komplexbildung als Ferrozin-Eisen schützende lipophile Komponente zu existieren, deren eigentlicher Aufenthaltsort seinem Löslichkeitsverhalten nach wohl die Cytoplasmamembran sein sollte.

Blinov et al. (4) beobachtet, daß die Produktion des Eisen(II)-Komplexbildners Desferroviridomycin von dem Eisengehalt des zur Anzucht verwendeten Mediums abhängt. Desferroviridin kann in 60 Stämmen von Streptomyceten nachgewiesen werden. Mößbauerspektroskopie-Untersuchungen zeigten, daß das Eisen in den Viridomycinen einen bivalenten Status aufweist. Sie sind in der Lage, Fe^{3+} von Trihydroxamatsäuren zu übernehmen, sind aber als Fe^{2+}-Komplex am stabilsten. Die Rolle des Fe(II)-Donators für den intrazellulären Nicht-Häm und Häm-Eisen-Pool der Streptomyceten wird diskutiert.

Bei Neurospora crassa konnte noch keine Fe(II)-Komponente identifiziert werden, die das Eisen des Coprogens zu übernehmen in der Lage ist.

Ein Modell zur Coprogenaufnahme wird vorgeschlagen.

Modellvorschlag zum Coprogentransport



☆ Fe^{2+}

★ Fe^{3+}

○ Desferricoprogen

● Coprogen

□ Siderochrom-Transportsystem

■ Siderochom-Transportsystem + Coprogen

◎ Fe^{2+}-Bindungskomponente

Fe^{2+}-Bindungskomponente + Fe^{2+}

◇ Siderochrom-Oxido-Reduktase

5. ZUSAMMENFASSUNG

Coprogenaufnahmekinetiken im Eisenmangel zeigen eindeutiges Sättigungsverhalten. Der K_m-Wert der Coprogenaufnahme liegt bei 5 µM, der V_{max}-Wert bei 1 $nmol \cdot mgTG^{-1} \cdot min^{-1}$.
Kinetiken mit eisenversorgten Mycelien lassen sich mit sättigungskinetischen Kriterien nicht in Übereinstimmung bringen.

Hemmungskinetische Versuche mit Ferrirubin, Dextran-Coprogen, 11C, F11C zeigen deutlich kompetitiven Charakter. Der K_i-Wert der Ferrirubinhemmung des Coprogentransports liegt mit 0.05 µM um zwei Zehnerpotenzen niedriger als der K_m-Wert der Coprogenaufnahme selbst. Die Werte der Affinität der derivatisierten Coprogenmoleküle (Coprogen-Dextran, 11C, F11C) gegenüber dem Siderochromtransportsystem liegen in derselben Größenordnung wie der K_m-Wert des Substrats selbst.

Ferrirubin zeigt trotz seiner hohen Affinität gegenüber dem Siderochromtransportsystem eine äußerst geringe Transportrate, die mit zeitabhängigen Ferrirubinaufnahmeversuchen als Anlagerungsreaktion charakterisiert werden konnte.

Dies ermöglichte quantitative Untersuchungen zum Transportsystem der Siderochrome. Es konnte die Wechselzahl einer Transportstelle für ^{55}Fe mit 0.13 sec^{-1} bestimmt werden. Als Transportstellenanzahl pro μ^2 ergab sich 5400.

Aufnahmeversuche mit doppeltmarkiertem Coprogen weisen auf eine zeitlich und räumlich enge Kopplung des Transports mit der Trennung des Moleküls in Zentralion und Ligand hin.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des Inkubationsmediums und Bestimmungen mit Ferrozine weisen auf eine reduktiv verlaufende Trennung des Coprogenmoleküls in Desferricoprogen (ev. Spaltprodukte) und Fe^{2+} hin.

Bindung, Translokation und Trennung des Coprogenmoleküls, alle drei Phänomene zeigen Sensibilität gegenüber Hemmstoffen des mikrobiellen Stoffwechsels, wie KCN, DNP und N_2.

Die freie Diffusion der Siderochrommoleküle durch die Cytoplasmamembran als sogenannte Ionophoren konnte damit ausgeschlossen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Arceneaux, J.E.L.; Davis, W.B.; Downer, D.N.; Haydon, A.H.; Byers, R.B.: Fate of labeled hydroxamates during iron transport from hydroxamate-iron chelates. J.Bacteriol. 115, 919 - 927 (1973)

2. Arceneaux, J.E.L.; Byers, B.R.: Ferric hydroxamate transport without subsequent iron utilization in *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol. 127, 1324 - 1330 (1976)

3. Biedermann, G.; Schindler, P.: On the solubility product of precipitated iron (III) hydroxide. Acta chem. scand. 11, 731 - 737 (1957)

4. Blinov, N.O.; Blinova, I.N.; Khokhlov, A.S.: Viridomycins and actinoviridins - antibiotics and pigments of the o-nitrosophenol group: Their role in the iron metabolism in streptomycetes. International Symposium of Antibiotics. 14. - 18. May, Weimar, GDR (1979)

5. Carrano, C.J.; Raymond, N.R.: Coordination chemistry of microbial iron transport compounds: Rhodotorulic acid and iron uptake in *Rhodotorula pilimanae*. J.Bacteriol. 136, 69 - 74 (1978)

6. Davis, R.H.; Lawless, M.B.; Port, L.A.: Arginaseless Neurospora: Genetics, physiology and polyamine synthesis. J.Bacteriol. 102, 299 - 305 (1970)

7. Diekmann, H.: Vorkommen und Strukturen von Coprogen B und Dimerumsäure. Arch.Microbiol. 73, 65 - 76 (1970)

8. Emery, T.: Hydroxamic acids of natural origin. Adv. in Enzymol. 35, 135 - 180 (1970)

9. Emery, T.: Role of ferrichrome as a ferric ionophore in *Ustilago sphaerogena*. Biochem. 10, 1483 - 1488 (1971)

10. Emerson, S.: A plasmodioid variant of *Neurospora crassa*. Genetica 34, 162 - 182 (1963)

11. Estell, D.A.; Wilson, K.A.; Laskowski, M.: Thermodynamics and kinetics of the Hydrolysis of the reactive-site peptide bond in pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) by *Dermasterias imbricata* Trypsin 1. Biochem. 19, 131 - 137 (1980)

12. Ernst, J.: Versuche zur Charakterisierung des sideraminabhängigen Eisentransportsystems in *Neurospora crassa arg-5, ota, aga*. Diplomarbeit Tübingen 1974

13. Ernst, J.: Zur Bedeutung der Plasmamembran für die Sideraminaufnahme bei *Neurospora crassa*. Dissertation Universität Tübingen 1976

14. Ernst, J.; Winkelmann, G.: Enzymatic release of iron from sideramines in fungi. NADH: Sideramine oxidoreductase in *Neurospora crassa*. Biochim.Biophys.Acta 500, 27 - 41 (1977)

15. Fastrich, D.: Untersuchungen zur Regulation der Sideraminbildung und zum Eiseneinbau aus Sideraminen in Protoporphyrin IX bei *Neurospora crassa arg-5, ota, aga*. Dissertation Universität Tübingen 1974

16. Hantke, K.; Braun, V.: Membrane receptor dependent iron transport in *Escherichia coli*. FEBS Letters 49, 301 - 305 (1974)

17. Hartmann, E.: Vorkommen und Verteilung von Sideraminen in *Neurospora crassa* sowie Versuche zur Eisenaufnahme. Dissertation Universität Tübingen 1973

18. Heijne, G.V.; Blomberg, C.: Trans-membrane translocation of proteins. Eur.J.Biochem. 97, 175 - 181 (1979)

19. Kalthoff, I.M.; Elving, P.J.: Treatise on analytical chemistry. 2nd ed. Thomas, Springfield, Illinois (1962)

20. Keller-Schierlein, W.; Prelog, V.; Zähner, H.: Siderochrome. (Natürliche Eisen(III)-trihydroxamat-Komplexe). Progress in the chem. of organic natural products. 22,279. Springer Verlag (1964)

21. Keller-Schierlein, W.; Diekmann, H.: 242. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 85. Mitt.: Zur Konstitution des Coprogens. Helv.Chim.Acta 53, 2035 - 2044 (1970)

22. Lactimer, W.L.: Oxidation potentials. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York 224 (1952)

23. Leon, J.; Neilands, J.B.: Mechanism of siderophore iron transport in enteric bacteria. J.Bacteriol. 126, 823 - 830 (1976)

24. Leon, J.; Neilands, J.B.; Raymond, K.N.: Coordination isomers of biological iron transport compounds III. (1) Transport of Δ-cis-chromic Desferriferrichrome by *Ustilago sphaerogena*. J.Amer.Chem.Soc. 97, 293 - 296 (1975)

25. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

26. Neilands, J.B.: Hydroxamic acids in nature. Science 156, 3781 - 3801 (1967)

27. Neilands, J.B., (ed.): Microbial iron metabolism. Academic Press New York, London (1974)

28. Neilands, J.B.: Naturally occuring non-porphyrin iron compounds. In: Structure and Bonding, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 59 - 108 (1974)

29. Norrestam, R.; Stensland, B.; Bränden, C.T.: On the conformation of the cyclic iron-containing hexapeptides: The crystal and molecular structure of ferrichrysin. J.Mol.Biol. 99, 501 - 506 (1975)

30. Ovchinnikov, Yu.A.: Ion transport in membranes and the ionophore problem. In: Frontiers in bioorganic chemistry and molecular biology (Yu.A. Ovchinnikov and M.N. Kolosov, eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, Oxford, New York 1979

31. Padmanaban, G.; Sama, P.S.: Cobalt toxity and iron metabolism in *Neurospora crassa*. Biochem J. 98, 330 - 334 (1970)

32. Peters, W.J.; Warren, R.A.J.: The mechanism of iron uptake in *Bacillus subtilis*. Can.J.Microbiol. 16, 1285 - 1291 (1970)

33. Pressman, B.C.: Metabolic states of protein-bond phosphate. Fed.Proc. 23, 425 - 432 (1965)

34. Pressman, B.C.: Induced active transport of ions in mitochondria. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 53, 1076 - 1083 (1965)

35. Ratledge, C.: Iron transport in *Mycobacterium smegmatis:* The role of mycobactin. Biochim.Biophys.Acta 279, 58 - 74 (1972)

36. Snow, G.A.: Isolation and structure of mycobactin T, a groth factor. Metall-complexes of Mycobactin P and of desferrisideramines. Biochem.J. 115, 1031 - 1040 (1969)

37. Scarborough, G.A.: Isolation and characterisation of *Neurospora crassa* plasma membranes. J.Biol.Chem. 250, 1106 - 1111 (1975)

38. Slayman, C.L.; Slayman, C.W.: Depolarisation of the plasmamembrane of N.crassa during active transport of glucose; evidence for a proton-dependent cotransport. Proc.Natl.Acad.Sci. 71, 1931 - 1939 (1974)

39. Slayman, C.L.; Lu, C.Y.-H.; Shane, L.: Correlated changes in membrane potential and ATP concentration in *Neurospora*. Nature 226, 274 - 276 (1970)

40. Slayman, C.L.; Long, W.S.; Lu, C.Y.-H.: The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*. J.Membr.Biol. 14, 305 - 338 (1973)

41. Spiro, T.G.; Bates, G.; Saltman, P.: The hydrolytic polymerization of ferric citrate. II. The influence of excess citrate. J.Amer.Chem.Soc. 89, 5559 - 5562 (1967)

42. Stein, W.D.: Electrical properties of *Neurospora crassa*: Effects of external kations on the intracellular potential. J.Gen.Physiol. 49, 62 - 92 (1965)

43. Winkelmann, G.: Metabolic products of microorganisms, 132. Uptake of iron by *Neurospora crassa*. III. Iron transport studies with ferrichrome-type compounds. Arch.Microbiol. 98, 39 - 50 (1974)

44. Winkelmann, G.; Barnekow, A.; Ilgner, D.; Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 115. Mitt. Eisenaufnahme bei *Neurospora crassa*. II. Regulation der Sideraminbildung und Inhibition des Eisentransports durch Metallanaloge des Coprogens. Arch.Mikrobiol. 92, 285 - 300 (1973)

45. Winkelmann, G.: Evidence for stereospecific uptake of iron chelates in fungi. FEBS Letters 97, 43 - 46 (1979)

46. Winkelmann, G.; Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 115. Mitt. Eisenaufnahme bei *Neurospora crassa*. I. Zur Spezifität des Eisentransports. Arch.Mikrobiol. 88, 49 - 60 (1973)

47. Emery, T.: Malonichrome, a new iron chelate from *Fusarium roseum*. Biochim.Biophys.Acta 629, 382 - 390 (1980)

48. Macham, L.P.; Ratledge, C.; Nocton, J.C.: A new group of water soluble iron binding compounds from *Mycobacteria*: The exochelins. J.Gen.Mikrobiol. 89, 379 - 382 (1975)

L E B E N S L A U F

Ich kam am 5.3.1950 in Karlsruhe als Sohn des Kapellmeisters Rolf Schickle und seiner Frau Marianne Schickle geb. Leibfritz zur Welt. In Birkenfeld bei Pforzheim besuchte ich von 1956 - 1957 die Volksschule.

Nach dem Tode meines Vaters übersiedelte meine Mutter nach Ebingen, der heutigen Albstadt-1, wo ich bis 1960 die dortige Volksschule und bis 1963 das Gymnasium besuchte.

Die weiteren Gymnasiumsjahre samt Abitur im Jahre 1968 absolvierte ich an der Internatschule Urspring, die ich wegen Aufnahme beruflicher Tätigkeit meiner Mutter aufsuchen mußte.

Von 1968 an war ich zum Zwecke des Studiums der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen immatrikuliert. Das Studium wurde 1974 mit der Diplomprüfung abgeschlossen.

1975 - 1978 arbeitete ich als Diplom-Biologe am Projekt CUS (Computer-unterstützte-Simulation im naturwissenschaftlichen Hochschulunterricht).

Ab 1978 erfolgte Promotion im Institut für Biologie II, am Lehrstuhl für Mikrobiologie I, unter der Leitung von Prof. Dr. Günther Winkelmann.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Ernst Bayer, Prof. Dr.Dr.h.c. Helmut Metzner,
Prof. Dr. Berthold Schwemmle, Prof. Dr. Ulrich Weser,
Prof. Dr. Günther Winkelmann, Prof. Dr. Hans Zähner.